



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUANTIFICAÇÃO DO DOMÍNIO EXTRACELULAR DO ONCOGENE HER-2 NO SORO DE
GATAS COM CARCINOMAS MAMÁRIOS – OTIMIZAÇÃO E RELEVÂNCIA CLÍNICA

NUNO FILIPE RAMOS COELHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutor António de Freitas Duarte

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria de Fátima Cabral da Rocha
Cardoso

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUANTIFICAÇÃO DO DOMÍNIO EXTRACELULAR DO ONCOGENE HER-2 NO SORO DE
GATAS COM CARCINOMAS MAMÁRIOS – OTIMIZAÇÃO E RELEVÂNCIA CLÍNICA

NUNO FILIPE RAMOS COELHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutor António de Freitas Duarte

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria de Fátima Cabral da Rocha
Cardoso

2013

LISBOA

Dedicatória

Esta tese merece duas dedicatórias:

Uma, à classe Médico-Veterinária, tão pouco falada neste país, mas tão essencial;

Outra, aos meus pais, por serem, incansável e incondicionalmente, os melhores pais do mundo, e por mostrarem que os Valores de uma pessoa ainda são o mais importante.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, pelo seu trabalho incansável como Orientador, por estar sempre lá quando é preciso, por ser um motivador nato, pelo sentido de humor, e em suma, por toda a ajuda prestada no decorrer do estágio e da dissertação. Sem o seu empenho isto seria tudo mais complicado.

À Dra. Maria João, pelo extraordinário acompanhamento que me prestou durante todo o estágio, por todas as dúvidas que me esclareceu, por me ter introduzido na vida de laboratório, por me ter aturado sempre (e as minhas distrações) e, enfim, por ser uma pessoa magnífica.

À Professora Doutora Fátima Cardoso, por, gentilmente, ter aceitado co-orientar a minha tese de mestrado integrado.

Ao Professor Doutor Jorge Correia e à Professora Conceição Peleteiro, pelos ensinamentos transmitidos, quer durante as aulas, quer durante o período de estágio e pelos conselhos (sempre preciosos) que foram dando.

À Equipa HER-2 (André e Tiago), por estarem lá sempre durante os 6 meses do estágio.

Às técnicas de Anatomia Patológica (Dra. Maria do Rosário e Dra. Sandra), D. Maria Augusta e D. Manuela pela simpatia sempre demonstrada.

À Dra. Margarida Simões, pelo carinho e simpatia que sempre foi cultivando.

A todo o pessoal do CIISA, que de uma forma ou de outra, sempre souberam ajudar e a todo o pessoal do Hospital Escolar, foram preciosos na minha formação.

A todos os Professores desta Casa, não nos podemos esquecer que são fulcrais em qualquer percurso académico.

Aos meus queridos amigos Lisboetas (da turminha B), por terem tornado estes 6 anos inesquecíveis (e que venham muitos mais). Sempre souberam mostrar que os veterinários são pessoas fenomenais.

Aos meus albicastrenses favoritos, por sermos os amigos que somos, da maneira que somos, desde o tempo dos Dinossauros. Que venha o futuro!

Aos meus tios e à minha prima, que me acolheram muito bem no meu primeiro ano em Lisboa.

Às minhas avós, figuras magistrais da minha existência.

Aos meus pais, o meu porto de abrigo. Dizer que isto não seria possível sem eles é dizer pouco. Absoluta e inequivocamente, os heróis da minha vida.

QUANTIFICAÇÃO DO DOMÍNIO EXTRACELULAR DO ONCOGENE HER-2 NO SORO DE GATAS COM CARCINOMAS MAMÁRIOS – OTIMIZAÇÃO e RELEVÂNCIA CLÍNICA

Resumo

O facto dos tumores mamários felinos (TMF) serem a terceira neoplasia mais frequente, traduz o interesse e a relevância que esta condição patológica assume no contexto da medicina felina. À semelhança dos tumores mamários da Mulher, os TMF dividem-se em vários subtipos moleculares, sendo um deles o subtipo HER-2 positivo (HER-2+) que, na espécie humana, se deve à amplificação do replicão que codifica este oncogene e/ou à sobreexpressão do recetor proteico HER-2 que mostra localização na membrana citoplasmática das células tumorais.

Na Gata, os TMF-HER-2+ mostram uma incidência díspar, consoante o estudo (5,5 a 57%), indicando a carência da validação de técnicas standardizadas para a avaliação deste subtipo molecular, de forma a se perceber a sua importância nesta espécie. Desta forma, a otimização e a standardização de técnicas de diagnóstico baseadas no HER-2 (tecidulares - IHQ e FISH; ou séricas - ELISA e *Dot Blot*) assume especial importância. Nesse sentido, decidiu-se averiguar a presença e quantificar o domínio extracelular do HER-2 no soro (sHER-2) de gatas com adenocarcinoma mamário, através da técnica de *Dot Blot*. Esta técnica conseguiu detetar a fração proteica do HER-2 no soro e permitiu semi-quantificá-la, tendo os valores obtidos mostrado concordância estatística com a avaliação por IHQ, nos TMF com metástases nos linfonodos.

Palavras-chave: carcinoma mamário felino; HER-2; sHER-2; *Dot Blot*; Gata

QUANTIFICATION OF THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE HER-2
ONCOGENE IN SERUM OF CATS WITH MAMMARY CARCINOMAS -
OPTIMIZATION AND CLINICAL RELEVANCE

Abstract

The high interest and relevance of mammary carcinomas in feline medicine rely on its importance in clinical practice, as it is the third most common neoplasia in cats.

Feline mammary carcinomas (FMCs) have showed different molecular subtypes. One of them is the HER-2+ subtype, which is caused by overexpression of the HER-2 protein.

FMCs HER-2+ have demonstrated a highly variable prevalence (5,5 to 57%), revealing the lack of standardized techniques to diagnose this subtype, in this specie.

Considering this scenario, both optimization and standardization of the diagnosis procedures for HER-2 evaluation (in tissue - IHC and FISH or in serum - ELISA and *Dot Blot*) are essential.

Taking into account that the HER-2 evaluation in tissues has some limitations, we intended to verify the presence of the HER-2 extracellular domain in serum (sHER-2) in cats with FMC, using the *Dot Blot* technique.

This technique allowed the detection of this protein fraction in cats' sera for the first time and permitted its semi-quantification, which was statistically concordant with IHC in regional metastatic FMCs.

Key-words: Feline mammary carcinomas; HER-2; sHER-2; *Dot Blot*; Cat

Índice Geral

Dedicatória -----	i
Agradecimentos -----	iii
Resumo -----	v
Abstract -----	vii
Índice geral -----	ix
Índice de figuras -----	x
Índice de tabelas -----	xi
Lista de abreviaturas -----	xi
Introdução geral -----	1
Parte I) Revisão bibliográfica	
1. Anatomia, histologia e fisiologia da glândula mamária felina -----	3
2. Tumores mamários felinos -----	5
2.1. Epidemiologia -----	5
2.1.1. Incidência -----	6
2.1.2. Raça -----	6
2.1.3. Idade -----	6
2.1.4. Sexo -----	6
2.1.5. Neoplasia maligna <i>versus</i> benigna -----	6
2.2. Etiologia -----	7
2.2.1. Fatores hormonais -----	7
2.2.2. Fatores alimentares -----	8
2.2.3. Fatores virais -----	8
2.2.4. Fatores genéticos -----	9
2.3. Patogenia -----	10
2.4. Diagnóstico/Terapêutica -----	12
2.4.1. Cirurgia -----	13
2.4.2. Quimioterapia -----	14
2.4.3. Anti-inflamatórios -----	14
2.5. Gata como modelo comparativo -----	14
3. Classificação dos Tumores mamários -----	15
3.1. Classificação histopatológica -----	16
3.2. Prognóstico -----	18
3.3. Molecular -----	21
4. Tumores mamários HER-2 positivos (HER-2+) -----	25
4.1. Família HER -----	25
4.2. HER2 -----	31
4.2.1. Papel fisiológico -----	32
4.2.2. Mecanismo de ativação -----	33
4.2.3. Sobreexpressão/amplificação -----	35
4.2.4. Características clínicas dos TM HER-2+ -----	37
4.3. Importância do diagnóstico de TM HER-2+ -----	38
4.3.1. Valor prognóstico -----	38
4.3.2. Valor preditivo -----	39
4.3.3. Terapêutica -----	40
4.4. Diagnóstico dos TM HER-2+ -----	40
4.4.1. Ao nível do ADN -----	41
4.4.2. Ao nível do ARN -----	43

4.4.3. Ao nível da proteína -----	44
4.5. Fator sérico HER-2 (sHER-2) -----	47
4.5.1. Formação do sHER-2 -----	51
4.5.2. Utilidade do sHER-2 -----	53
4.5.2.1. Indicador de prognóstico -----	53
4.5.2.2. Valor preditivo -----	54
4.5.2.3. Monitorização da terapêutica -----	56
4.5.2.4. Diagnóstico de recidiva -----	56
4.5.3. Quantificação do sHER-2 -----	56
Parte II) Otimização da técnica de <i>Dot Blot</i> para quantificação do sHER-2 em TMF HER-2+	
1. Material e métodos -----	
1.1. Pacientes e espécimens -----	61
1.2. Imunohistoquímica -----	62
1.3. Cultura de células e <i>Western Blot</i> -----	62
1.4. <i>Dot Blot</i> -----	63
1.4.1. Material utilizado -----	63
2. Resultados -----	
2.1.1. Otimização da técnica -----	65
2.1.2. Doseamento do sHER-2 em Gatas com TMF HER-2+-----	73
3. Discussão -----	77
4. Conclusões -----	81
5. Bibliografia -----	82
Anexos -----	110

Índice de figuras

Figura 1. Esquema arquitetura normal glândula mamária -----	3
Figura 2. Esquema representando TM -----	3
Figura 3. Anatomia da glândula mamária e rede linfática -----	4
Figura 4. Tabela com sistema de classificação TNM para TMF -----	18
Figura 5. Família HER e vias de sinalização celular -----	26
Figura 6. Estrutura do HER-2 -----	32
Figura 7. Mecanismo de dimerização da família HER -----	34
Figura 8. Microfotografias de IHQ para HER-2, em TMF -----	45
Figura 9. Esquema técnica de <i>Dot Blot</i> -----	60
Figura 10. Ensaio de otimização <i>Dot Blot</i> com membrana de nitrocelulose e PVDF ---	66
Figura 11. Ensaio de otimização com secagem na estufa e à temperatura ambiente ----	67
Figura 12. Aparelho de vácuo Snap i.d. ® -----	67
Figura 13. Ensaio de otimização em PVDF com sistema de vácuo -----	68
Figura 14. Ensaio de otimização com lavagem em vácuo -----	68
Figura 15. Ensaio de otimização com anticorpo A0485 -----	68
Figura 16. Ensaio de otimização com anticorpo 4B5 -----	68
Figura 17. Ensaio de otimização com 4B5 a 1:10 -----	69
Figura 18. Ensaio de otimização com 4B5 a 1:20 -----	69
Figura 19. Ensaio de otimização com anticorpo SP3 -----	69
Figura 20. Ensaio de otimização com 1:35000 de Ac secundário -----	70
Figura 21. Ensaio de otimização com 1:70000 de Ac secundário -----	70

Figura 22. Ensaio de otimização com diferentes tempos de exposição -----	71
Figura 23. Ensaio de otimização com impacto da congelação -----	71
Figura 24. Ensaio de otimização com várias quantidades pipetadas -----	72
Figura 25. Ensaio de otimização com amostras hemolisadas -----	72
Figura 26. Ensaio de otimização para comprovar reprodutibilidade -----	72
Figura 27. Diluições padrão de sHER-2 -----	73
Figura 28. Imagem ilustrativa de ensaio otimizado, com resultados finais -----	73

Índice de tabelas

Tabela 1 – Tabela comparando os diferentes resultados obtidos entre a IHQ e o <i>Dot Blot</i> , com diferentes <i>cutoffs</i> -----	74
Tabela 2 – Tabela com o valor de correlação de Kendall obtido em TMM, com cutoff de 15 ng/ml -----	76
Tabela 3 – Tabela com o valor de correlação de Kendall obtido em TMM, com <i>cutoff</i> de 10 ng/ml -----	76

Lista de abreviaturas

aa - Aminoácido
 Ac - Anticorpo
 ADAM – A disintegrin and metalloproteases (desintegrinas e metaloproteases)
 ADN – Ácido desoxirribonucleico
 Ag - Antigénio
 AgNORs – Regiões Organizadoras Nucleolares Arginofílicas
 Akt – Proteína quinase B
 ARN – Ácido ribonucleico
 ASCO – American Society of Clinical Oncology (Sociedade Americana de Oncologia Clínica)
 BRCA1 - Breast cancer 1, early onset (Gene Cancro mamário 1, início precoce)
 BSA – Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
 BSAVA - British Small Animal Veterinary Association
 CA 15-3 – Carbohydrate antigen 15-3 (antigénio carbohidrato 15-3)
 cADN - Ácido desoxirribonucleico complementar
 CEA – Carcinoembryonic antigen (antigénio carcino-embriónico)
 CEP17 – Centromeric probe 17 (sonda centromérica do cromossoma 17)
 CISH - Chromogenic *in situ* hybridization (hibridização cromogénica *in situ*)
 CK – Citokeratin (citoqueratina)
 CLIA - Chemiluminescent immunoassay (imunoensaio quimioluminescente)
 cm - centímetro
 cm³ –centímetros cúbicos
 COX-2 – Cicloxygenase 2
 CTF – Carboxyl-terminal fragment (fragmento terminal carboxilo)
 DAB – Diaminobenzidina
 DEC – Domínio extracelular
 DFS – Disease-free survival (sobrevivência sem doença)

DIC – Domínio intracelular
 DTM – Domínio transmembranário
 ECL – Enhanced chemiluminescence (amplificador de quimioluminescência)
 EGF – Epidermal growth factor (fator de crescimento epidérmico)
 EGFR – Epidermal growth factor receptor (recetor de fator de crescimento epidérmico)
 EIA - Enzyme immunoassay (imunoensaio enzimático)
 ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoadsorvente ligado a enzima)
 FACTT - Fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique (amplificação fluorescente catalizada pela técnica de T7 polimerase)
 FAS - Fosfatase alcalina
 FASN - Fatty acid synthase (sintase de ácidos gordos)
 FeLV – Feline leukemia virus (Vírus da leucemia felina)
 FISH - Fluorescent *in situ* hybridization (hibridização fluorescente *in situ*)
 FMV – UL – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
 G – Força G
 GH – Growth hormone (hormona de crescimento)
 HAIA - Human anti-animal immunoglobulin antibodies (anticorpos humanos anti-animal)
 HAMA - Human Anti-Mouse Antibodies (anticorpos humanos anti-rato)
 HB-EGF – Heparin-binding EGF-like growth factor (fator de crescimento semelhante a EGF, ligado à heparina)
 HER – Human epidermal growth factor receptor (recetor de fator de crescimento epidérmico humano)
 HP - Histopatológica
 HRP - Horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)
 HSP90 - Heat shock protein 90 (proteína de choque térmico 90)
 IgG – Imunoglobulinas de classe G
 IHC – Immunohistochemistry (imunohistoquímica)
 IHQ – Imunohistoquímica
 iNOS - Induced Nitric oxide synthases (sintases de óxido nítrico induzidas)
 kDa - Kilodalton
 m² - metros quadrados
 MAPK – Mitogen-activated protein kinase (proteína quinase ativadora de mitogénios)
 mARN - Ácido ribonucleico mensageiro
 ME – Matriz extracelular
 mg - miligrama
 ml – mililitro
 MMP – Matrix metalloproteases (metaloproteases da matriz)
 MPLA – Multiplex ligation-dependent probe amplification (amplificação de sonda dependente da ligação múltipla)
 NRG – Neuroregulina
 °C – Graus centígrados
 OS – Overall survival (sobrevivência total)
 OVH – Ovariohisterectomia
 PAAF – Punção aspirativa de agulha fina
 PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen (antigénio nuclear de células em proliferação)
 PCR – Polymerase in chain reaction (reação de polimerase em cadeia)

PEMS - Piezoelectric microcantilevers sensors (sensores piezoelétricos de microcantileveres)

PI3K – Phosphatidylinositol-3 kinase (fosfatidilinositol 3-quinase)

PTEN – Phosphatase and tensin homolog (proteína homóloga da fosfatase e tensina)

PVDF – Polyvinylidene difluoride (difluoreto de polivinilideno)

RE – Recetores de estrogénio

RON – Macrophage-stimulating protein receptor (recetor proteico estimulante de macrófagos)

RP – Recetores de progesterona

sHER-2 – Fator sérico do recetor HER-2

SISH - Silver *in situ* hybridization (hibridização por prata *in situ*)

SOCS5 – Suppressor of cytokine signaling 5 (supressor da sinalização da citocina 5)

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription (transdutores de sinal e ativadores da transcrição)

T1 – Glândula mamária torácica cranial

T2 – Glândula mamária torácica caudal

TBS – Tris buffered saline (tampão tris salino)

TGF – Transforming growth factor (fator de crescimento transformador)

TIC – Tumor initiating cells (células iniciadores do tumor)

TIMP - Tissue inhibitors of metalloproteases (inibidores tecidulares de metaloproteases)

TM – Tumor mamário

TMF – Tumor mamário felino

TMM – Tumor mamário metastático

TMP – Tumor mamário primário

TNM – Tumor-Nodo-Metástase

TOPII α – Topoisomerase II-alfa

TQ – Tirosina Quinase

TTF – Time to treatment failure (tempo até à falha do tratamento)

TTP – Time to progression (tempo até à progressão da doença)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (fator de crescimento endotelial vascular)

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

μ L – microlitro

Introdução geral

Esta monografia assume o contexto duma dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária, inserida no âmbito do estágio final de curso. Este estágio compreendeu duas partes: uma primeira parte realizada no laboratório do CIISA (Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal) da FMV-UL (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa), sob o pretexto dum trabalho de Investigação em Oncologia e uma segunda parte, realizada no Hospital Escolar da FMV-UL, comportando um estágio clínico.

O tema do estágio de Investigação teve por base um estudo sobre o tema “Oncologia mamária na espécie felina”, nomeadamente o diagnóstico do *status* HER-2 e a otimização de uma nova técnica (*Dot Blot*) com vista a alcançar este propósito. O aluno observou e realizou várias metodologias e técnicas de diagnóstico, como a imunohistoquímica para diferentes proteínas e marcadores (HER-2, RE, RP, Ki67), *Western Blot* e *Dot Blot*, observou e classificou histopatologicamente cortes de tecidos ao microscópio. Teve ainda contato com técnicas de cultura de células, PCR, imunofluorescência e técnicas de necrópsia.

Esta primeira parte do estágio perfeitamente, no total, 700 horas de trabalho, divididas ao longo de 6 meses, no período de Setembro de 2012 a Fevereiro de 2013, inclusive.

Na segunda parte, ou seja, o estágio clínico, foram atingidas 480 horas de trabalho, num espaço temporal que incluiu os meses de Março, Abril e Maio de 2013. Nesta rotação clínica, foram cumpridas as escalas de cirurgia (duas semanas), internamento (12 internamentos com 12 horas cada), imagiologia (uma semana, englobando radiografias, tomografias computadorizadas e endoscopias) e medicina interna, onde foi possível assistir e auxiliar nas consultas de medicina geral, vacinações, desparasitações, urgências, consultas de oftalmologia, de dermatologia, de ortopedia, de oncologia, de cardiologia, de endocrinologia e de reprodução.

Esta dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária tem como base um estudo, realizado na FMV-UL, acerca da otimização de uma técnica (*Dot Blot*) para determinar o *status* HER-2 no sangue, nomeadamente o seu fator sérico (sHER-2), em TMF.

Assim, primeiro havia o objetivo de averiguar se sHER-2 existia na espécie felina, de forma semelhante à Mulher, e em caso afirmativo, se o *Dot Blot* seria uma técnica eficaz e eficiente na quantificação deste biomarcador tumoral.

Uma vez que este procedimento nunca havia sido realizado para as espécies veterinárias (só fora utilizado uma vez na Mulher, em 2011, segundo a bibliografia consultada), foi necessário proceder a todos os passos de otimização da técnica, aos quais o estagiário assistiu e auxiliou.

A escolha deste tema prende-se com o facto de este ser tão atual quanto útil, uma vez que a área de oncologia tem necessidades gradualmente crescentes de investigação, afim de se conseguir dar mais respostas, quer em termos de diagnóstico, quer em termos de tratamento. Tendo em conta a importância que os TM têm na espécie felina, foi feita uma primeira revisão bibliográfica geral e, posteriormente, esta monografia versou mais especificamente acerca dos TM com sobreexpressão de HER-2 (HER-2+), com os mecanismos fisiológicos e patológicos subjacentes e com as formas de determinar o *status* HER-2 nos TM, quer em amostras tecidulares, quer em amostras sanguíneas.

Parte I) Revisão Bibliográfica

1. Anatomia, histologia e fisiologia da glândula mamária felina

Tal como as restantes espécies da classe *Mammalia* (Linnaeus, 1758), a espécie felina (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) tem, entre muitas outras características comuns, glândulas mamárias, através das quais produz leite para alimentar as crias durante os seus primeiros dias de vida, ao mesmo tempo que o colostro lhes fornece imunidade passiva (Cunningham, 2002).

Estas glândulas mamárias, que resultam duma modificação de glândulas sudoríparas, são formadas, individualmente, por conjuntos de glândulas túbulo-alveolares compostas, sendo também adjetivadas como glândulas apócrinas modificadas (Dellmann & Eurell, 1998). Cada uma destas é formada por uma parte parenquimatosa, em que a unidade funcional são os alvéolos, e pelo estroma, que é o tecido de suporte, onde estão localizados os vasos e os nervos (König & Liebich, 2004).

O tecido nobre mamário apresenta dois tipos de células epiteliais (ver figuras 1 e 2): as luminais, que fazem o revestimento dos ductos e dos alvéolos, e as mioepiteliais que facilitam a expulsão do leite, contraindo-se sob a ação da ocitocina (Cunningham, 2002). As células mioepiteliais dispõem-se em redor das células luminais e dos alvéolos (Junqueira & Carneiro, 2004), estando em contacto com a lâmina basal e com o estroma (Charafe-Jauffret *et al.*, 2007).

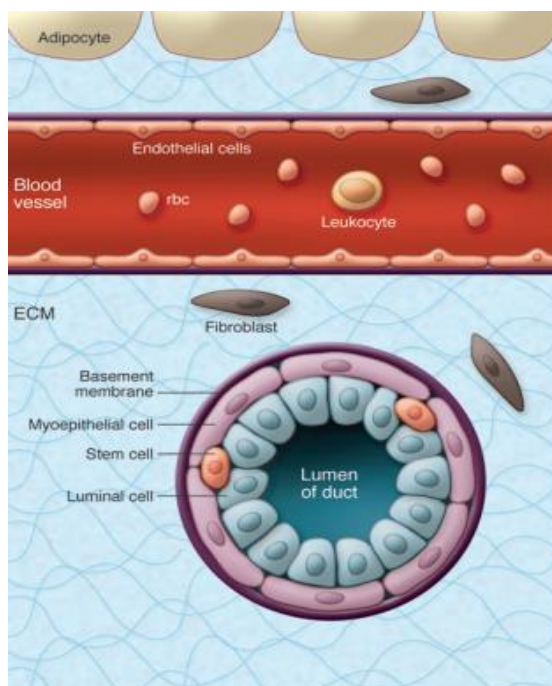


Figura 1 – Esquema representando a arquitetura normal da glândula mamária e tecido envolvente (extraído de Bertos & Park, 2011).

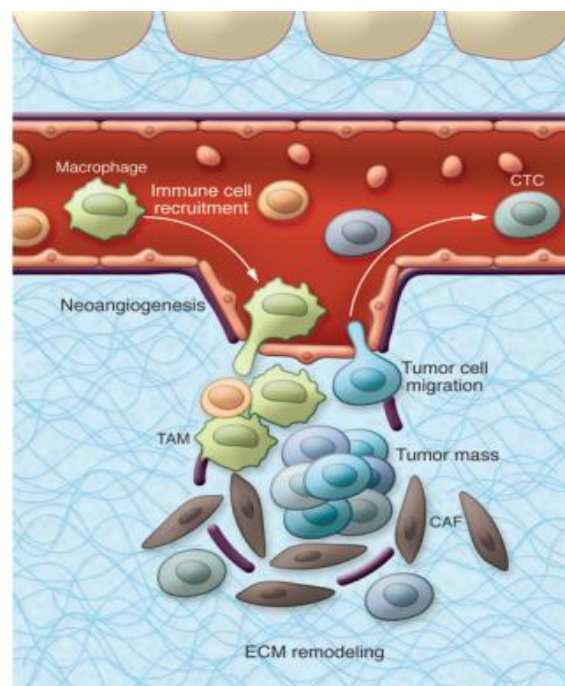


Figura 2 – Esquema representando um tumor mamário, com invasão de células tumorais e macrófagos (extraído de Bertos & Park, 2011).

Os alvéolos, que são estruturas circulares e côncavas (Cunningham, 2002), funcionam como unidade “secretora”, agrupando-se em lóbulos (König & Liebich, 2004). Cada lóbulo é separado dos circundantes por septos de tecido conjuntivo denso e por tecido adiposo. Múltiplos lóbulos convergem, formando um lobo (Junqueira e Carneiro, 2004).

De cada lóbulo desenvolve-se um pequeno ducto excretor intralobular (epitélio cubóide simples) que origina um ducto lactífero (König & Liebich, 2004) ou ducto galactóforo (epitélio cubóide duplo) (Cunningham, 2002), que por sua vez desemboca numa dilatação ampolar designada seio lactífero (König & Liebich, 2004) ou seio galactóforo (Cunningham, 2002). Enquanto os ductos servem, por definição, como sistema de transporte, os seios são utilizados como cisternas para recolha do leite. A partir destes, o leite tem acesso ao exterior, através do teto ou papila da mama (König & Liebich, 2004).

Em termos anatómicos, a gata tem quatro pares de glândulas mamárias (figura 3): dois pares torácicos, um par abdominal e um inguinal (Dyce & Wensing, 2010) ou dois pares torácicos e dois abdominais (Raharison & Sautet, 2006). Raramente, existem glândulas supra-numerárias (Dyce & Wensing, 2010). As glândulas estão dispostas bilateralmente, paralelas e a 3 centímetros da linha média, distribuindo-se desde a parte caudal da região peitoral até à região inguinal (Ellenport, 1986).

O teto, que pode apresentar até cerca de um milímetro de altura quando a gata não está lactante, pode aumentar até dez vezes o tamanho na altura da lactação. A gata mostra 4 a 8 aberturas em cada teto, que correspondem aos vários ductos da papila (Dyce & Wensing, 2010).

Em termos de vascularização, não se justifica o aprofundamento da matéria, salientando-se apenas que a glândula mamária é suprida pelas artérias: epigástrica cranial superficial, torácica interna e epigástrica superficial caudal. Em termos de circulação eferente, a veia epigástrica superficial cranial (que vai desembocar na veia torácica interna) e a veia epigástrica superficial caudal (que vai desembocar na veia pudenda externa) são as envolvidas (König & Liebich, 2004). Ainda acerca das veias, estas seguem um percurso muito semelhante às artérias, com exceção de algumas veias pequenas, que cruzam a linha média e que se julga serem responsáveis pela disseminação dos TM entre glândulas contralaterais (revisto por Giménez, Hercht, Craig & Legendre, 2010).

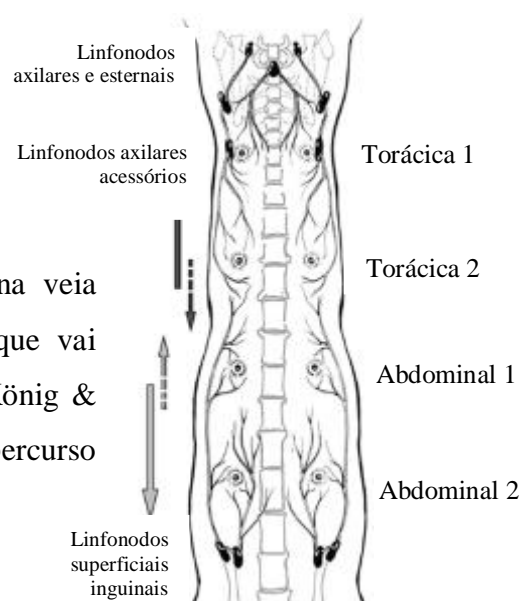


Figura 3 – Representação esquemática das glândulas mamárias na espécie felina e a sua rede linfática (extraído de Giménez *et al.*, 2010).

Relativamente à inervação da glândula mamária, só faz sentido nesta monografia a referência sumária à existência de fibras nervosas sensitivas autónomas (simpáticas e parassimpáticas). Os nervos projetam-se a partir dos ramos mamários lateral e medial dos nervos intercostais, dos ramos ventrais do nervo ílio-hipogástrico, ílio-inguinal, genito-femoral e de um ramo do nervo pudendo (König & Liebich, 2004).

Do ponto de vista oncológico, nunca é demais mencionar a rede linfática, ou seja, para que linfonodos drenam as diferentes glândulas mamárias, uma vez que este sistema tem assaz importância na metastização das neoplasias com sede neste órgão (Peleteiro, 1994). Segundo Dyce e Wensing (2010), os dois pares de glândulas mais craniais drenam para o linfonodo axilar, axilar acessório e esternal, ao passo que os dois pares de glândulas mais caudais drenam para os linfonodos inguinal superficial e epigástrico caudal. No entanto, segundo um estudo de Raharison e Sautet (2006), que recorreu à injeção de tinta da Índia, as duas glândulas intermédias (o par torácico caudal e o par abdominal cranial) drenam simultaneamente para o linfonodo inguinal superficial e para o linfonodo axilar, enquanto as glândulas torácicas craniais só drenam cranialmente (para linfonodo axilar) e as abdominais caudais só drenam caudalmente (para linfonodo inguinal). De salientar que os vasos linfáticos não passam para o lado contra-lateral, através da linha média (Raharison & Sautet, 2007).

O normal desenvolvimento da glândula mamária depende das hormonas sexuais femininas, em particular dos estrogénios, da progesterona e da prolactina, que regulam a estrutura da glândula, tanto micro como macroscopicamente (Cunningham, 2002).

Assim, na altura pós-natal os ductos lactíferos são rudimentares e pouco desenvolvidos, com o sistema mamário pouco desenvolvido; na puberdade, por ação dos estrogénios, ocorre uma grande proliferação de tecido conjuntivo e adiposo, acompanhada de proliferação ductal. Aquando da gestação, formam-se novos ductos por divisão das células epiteliais e, perto do termo da gestação, devido à ação hormonal (prolactina, somatomamotropina, glucocorticóides adrenais, estrogénio, progesterona e somatotropina), os ácinos começam a produzir leite e colostro (Peleteiro, 1994). Por fim, após a amamentação, ocorre involução mamária, com degenerescência parcial dos ácinos e dos ductos, que são substituídos por tecido conjuntivo e por tecido adiposo (König & Liebich, 2004).

2. Tumores mamários felinos

2.1) Epidemiologia

Em termos da prática clínica, os tumores mamários são uma das afeções tumorais mais frequentes, manifestando-se pela presença de um ou mais nódulos, ulcerados ou não, com ou sem secreção e com eventual saída de conteúdo hemorrágico ou exsudados, etc. (Baba, 2007).

Na verdade, os TMF são a terceira neoplasia mais frequente nesta espécie, a seguir aos tumores da pele e ao linfoma, respetivamente, a primeira e a segunda neoplasia mais frequentes em gatos (Misdorp, 2002). De referir, como contraponto, que os TM na cadela são mais incidentes, sendo nesta espécie (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) a neoplasia mais frequente (Peleteiro, 1994).

○ 2.1.1. Incidência

Em termos gerais, os TMF representam 12% de todos os tumores na espécie felina e 17% dos tumores em gatas. A incidência anual deste processo é de 12,8 animais por cada 100.000 felinos e de 25,4 por 100.000 gatas (Misdorp, 2002).

○ 2.1.2. Raça

A raça mais predisposta, ou seja, com maior risco de desenvolver TM é a raça Siamesa, que apresenta o dobro do risco em desenvolver TM face às restantes raças. Adicionalmente, a idade do primeiro diagnóstico tende a ser mais precoce que nas restantes raças (Hayes, Milne & Mandell, 1981). Contudo, apesar desta tendência, a raça não parece ser um fator de prognóstico (Hayes *et al.*, 1984).

○ 2.1.3. Idade

A idade média para o diagnóstico de TMF é 10-11 anos (Hayes *et al.*, 1981) ou 10-14 (Baba, 2007). Os intervalos de deteção são latos, existindo relatos entre os 9 meses e os 19 anos, em situações, obviamente, mais pontuais (Peleteiro, 1994).

○ 2.1.4. Sexo

Este processo patológico é quase exclusivo do sexo feminino. Hayes *et al.*(1981) realizaram um grande estudo epidemiológico onde concluíram que cerca de 98,2% dos TMF eram de animais de sexo feminino, enquanto apenas 1,8% eram de elementos do sexo masculino. Segundo uma revisão de Giménez e colegas (2010), 1-5% dos TMF ocorrem em machos. De realçar que nos machos, os poucos TM detetados são de animais castrados (Cotard, 1975, revisto por Peleteiro, 1994).

○ 2.1.5. Neoplasia maligna *versus* benigna

Na espécie felina, a proporção de neoplasias malignas/benignas é muito elevada: 9:1 (Hayes & Mooney, 1985) ou de 4:1 (Misdorp, Romijn & Hart, 1991). Outros autores referem percentagens de 94% (Cotard, 1975, citado por Peleteiro) ou de 91% (Hayden & Nielsen,

1971) para tumores mamários malignos. Recentemente, um estudo efetuado no laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL encontrou TMF malignos em 97% dos casos e 3% de lesões benignas (Costa, 2010). Esta grande percentagem de TM malignos é bastante superior à que se regista na cadela, onde a percentagem de TM malignos ronda os 30% (Misdorp, 2002) ou os 40% (Brearley, 1989).

É ainda de salientar que a maioria dos TMF são adenocarcinomas (de origem epitelial) (Hayden & Nielsen, 1971).

2.2) Etiologia

O cancro da mama, como é, comumente, conhecido, é uma entidade patológica com uma grande diversidade, devido à sua extensa heterogeneidade biológica (Vollan & Caldas, 2011). Nesse sentido, identificar a causa, ou as causas, responsáveis por um processo tumoral na glândula mamária é sempre um assunto assaz pertinente, mormente quando este tipo de neoplasias parece ter uma etiologia multifatorial (Modiano & Breen, 2007). Em termos genéricos, Misdorp (2002) atribui como eventuais causas oncogénicas fatores de ordem hormonal, alimentar, viral e genéticos.

○ 2.2.1. Fatores Hormonais

Causas hormonais, nomeadamente hormonas sexuais femininas (progesterona e estrogénios) são associadas aos TM, uma vez que este tipo de neoplasia aparece maioritariamente em gatas inteiras (Misdorp, 2002). Adicionalmente, é preciso ter em conta o efeito protetor que a ovariectomia confere. Na Gata, parece haver uma grande diferença na incidência, dependendo se são ovariectomizadas ou não (Misdorp, 2002), apesar dos TM nesta espécie serem menos hormono-dependentes que nas cadelas (Millanta *et al.*, 2005).

De facto, a OVH precoce diminui consideravelmente o aparecimento de TMF em gatas (Lana, Rutteman & Withrow, 2007); fêmeas que tenham feito a OVH antes dos 6 meses de idade apresentam risco de virem a desenvolver carcinoma mamário 91% menor em comparação com as fêmeas inteiras. Já quando a OVH é feita antes do 1º ano de idade, a redução na probabilidade de virem a ter carcinoma mamário é de 86% (Overley, Goldschmidt, Sherer & Sorenmo, 2005). Não obstante, apesar de muito menor, a OVH tardia também tem algum efeito protetor (Misdorp, 2002).

As hormonas sexuais parecem ter um efeito oncogénico, maioritariamente, durante os primeiros anos de vida, hipótese argumentada pela grande diminuição do efeito protetor da OVH em animais mais velhos (Pérez, Pena, Castillo & Nieto, 2000).

Em gatas, está também descrito por Misdorp (1991) que a administração regular de progestagénios (usados na prevenção do estro) tem associação com um aumento significativo do risco de TM malignos e benignos.

Na senda do que foi dito, em termos de recetores, tanto o tecido mamário normal, como o tecido mamário tumoral benigno são predominantemente positivos para recetores de estrogénio (RE) e para recetores de progesterona (RP). No entanto, a positividade para estes recetores é maior em lesões não neoplásicas e em TM benignos do que em carcinomas (Rutteman *et al.*, 1991). De facto, parece haver uma perda dos recetores de esteróides durante a progressão para a malignidade (Lana *et al.*, 2007).

A expressão dos RE em TMF é de, segundo os estudos, 25% (Morris *et al.*, 2008), 11,3% (Millanta *et al.*, 2005) ou 19% (de las Mulas *et al.*, 2000). A expressão dos RP está associada à expressão dos RE, mas também pode haver casos em que não haja expressão dos RE e exista expressão dos RP: há alguns TMF nesta situação, o que ajuda a explicar a menor dependência de alguns TMF em relação aos estrogénios e que têm, além disso, melhor prognóstico, segundo Wypig, Fom e Lorimier (2006); e casos em que haja expressão de RE sem expressão de RP (incomum) (de las Mulas *et al.*, 2002).

Ainda acerca da influência dos fatores hormonais, importa mencionar o eventual papel da Hormona de Crescimento (GH - Growth Hormone). Segundo alguns estudos, a sobreexpressão de GH, induzida pelas progestinas, é produzida na glândula mamária, onde vai atuar de forma autócrina e parácrina, afetando o ciclo epitelial. Isto pode condicionar a carcinogénese, apesar dos raros estudos serem inconclusivos e apenas realizados em cães (Leeuwen, Garderen, Rutteman & Mol, 2000).

○ 2.2.2. Fatores alimentares

É sugerido por Misdorp (2002) que os alimentos ricos em gordura e a obesidade aumentam o risco de TM, apesar de ainda não haver nenhum estudo conclusivo, até à data, no que concerne a este ponto em gatos. O autor sugere que os fatores nutricionais/alimentares, referidos anteriormente, modificariam a concentração e a disponibilidade de hormonas sexuais femininas, facto que poderia estar implicado na carcinogénese mamária. De facto, o tecido adiposo é uma fonte importante de estrogénios devido à aromatização dos androgénios, sendo o tecido mamário mais exposto a estrogénios (Enriori & Reforzo-Membrives, 1984).

○ 2.2.3. Fatores virais

Certos estudos demonstraram a presença de partículas virais, através de microscopia electrónica, em carcinomas mamários felinos (Calafat, Weijer & Daams, 1977). Essas

partículas eram antígenos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e antígenos de RD-114, um retrovírus. Segundo os mesmos autores, mas noutro estudo (Weijer, Calafat, Daams, Hageman & Misdorp, 1974), o facto de o FeLV estar presente em carcinomas mamários (e ausente em tumores benignos e tecidos mamários normais) de gatos *indoor* sem história de doença associada a FeLV, poderia implicar alguma relação causal, como carcinogénico biológico.

○ 2.2.4. Fatores genéticos

No que toca aos fatores genéticos como agentes etiológicos dos TMF, sabe-se, como já foi referido, da maior predisposição da raça Siamesa.

Além deste ponto, o cancro é, sem sombra de dúvida, uma doença não só, mas também genética, havendo numerosos genes implicados no desenvolvimento de vários tipos de cancro, como no carcinoma mamário (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Normalmente, a carcinogénese é um processo complexo e multigénico. São precisas pelo menos 5-6 mutações sequenciais para que a célula mostre as características que a tornam maligna, também designadas como os “Hallmarks of Cancer” (Hanahan & Weinberg, 2000):

1. Autossuficiência em fatores de crescimento;
2. Insensibilidade aos fatores de anti-crescimento;
3. Capacidade de evasão à apoptose;
4. Capacidade de replicação ilimitada;
5. Promoção da angiogénese;
6. Capacidade de invadir os tecidos e metastizar.

De facto, a instabilidade genética está implicada como sendo uma das eventuais causas de TM, sendo que a existência de anormalidades citogenéticas, como a amplificação/deleção génica ou a aneuploidia, se encontram bem descritos (Modiano & Breen, 2007).

Relativamente à segunda, está documentada a existência de aneuploidia (número anormal de cópias de DNA) nos TMF (Nicholas *et al.*, 2003), especialmente sob a forma de hipoploidia, detetada em estudos de citometria de fluxo, que determinaram existir 46,3% de aneuploidias em carcinomas mamários primários (Minke *et al.*, 1990). De referir que esta aneuploidia não se correlaciona com o tipo histológico de tumor, invasão vascular, tamanho ou grau de malignidade (Minke *et al.*, 1990), ou seja, por outras palavras, não parece condicionar o comportamento biológico do tumor.

Esta instabilidade genética é devida não só a erros na replicação do ADN e na segregação cromossómica, mas também a mecanismos operativos como as telomerasas (Modiano & Breen, 2007).

Adicionalmente, estão também envolvidos mecanismos epigenéticos (em que há alteração do fenótipo, sem haver alteração no genótipo), como modulação dos níveis de metilação do ADN (hipermetilação silencia genes e hipometilação procede à sua ativação), *imprinting* e modificação das histonas (Modiano & Breen, 2007).

Outra área onde a investigação oncológica, especialmente a da Mama, tem sido mais pujante, é no estudo da relação entre genes oncosuppressores e oncogenes com a instabilidade genética, e as consequências que daí advém ao nível da biologia tumoral.

Na verdade, sabe-se que existe um equilíbrio fisiológico entre esses dois tipos de genes, que quando é alterado conduz a uma maior facilidade para a génese de neoplasias (Modiano & Breen, 2007).

De facto, sabe-se que há mutações que modulam a atividade dos oncogenes (como uma mutação pontual no HER-2, que apesar de pouco comum, pode levar à sua ativação constitutiva, ou seja, independentemente da presença do ligando), através de um ganho de função dominante (basta um alelo afetado para haver efeito fenotípico), e mutações em genes oncosuppressores (como o *p53*, que pode sofrer mutação *missense* num alelo ou sofrer mutações pontuais), com perda recessiva de função, levando ao desenvolvimento de TM em gatos (Leeuwen, Hellmen, Corneline, Burgh & Rutteman, 1996; Modiano & Breen, 2007).

2.3. Patogenia

Informação acerca do desenvolvimento dos processos oncogénicos em TMF ou sobre os agentes que podem ser responsabilizados por tal é bastante reduzida (Misdorp, 2002). No entanto, podemos definir o cancro como o resultado fenotípico de uma série de eventos genéticos e não genéticos (ambientais, por exemplo) (Argyle & Khanna, 2007). O desenrolar de uma neoplasia passa, de modo muito genérico, por 3 fases: iniciação, promoção e progressão (Trosko, 2001).

A iniciação diz respeito a uma série de acontecimentos (como mutações) que conferem à célula vantagens na sobrevivência e/ou crescimento ilimitado. A iniciação é despoletada por um agente carcinogénico, que pode ser de vários tipos, como foi referido anteriormente (Modiano & Breen, 2007).

Assim, enquanto as hormonas têm influência na proliferação epitelial e na carcinogénese, as hormonas sexuais têm um papel mitogénico acentuado (Nandi, Guzman & Yang, 1995).

Além do papel das hormonas sexuais na iniciação da carcinogénese, outras hormonas estão envolvidas, como a GH (Misdorp, 2002).

Estão também descritas uma série de transformações, na espécie felina, com grande potencial carcinogénico. Estas transformações incluem a sobreexpressão de oncogenes (HER-2) ou a mutação de oncosuppressores, como o *p53* ou o BRCA1 (Misdorp, 2002; Modiano & Breen, 2007).

Os oncogenes, uma vez ativados, interrompem ou favorecem determinados mecanismos celulares que resultam, geralmente, em eventos somáticos ao nível do material genético. Geralmente, a sua ativação dá-se por amplificação/sobreexpressão (como no HER-2), mas também pode ter origem em mutações pontuais (mutações no HER-2 podem levar à ativação constitutiva), por translocações cromossómicas ou inserções retrovirais.

Há vários tipos de proto-oncogenes: fatores de crescimento, recetores para fatores de crescimento (HER, HER-2), proteínas quinases, transdutores de sinais, proteínas nucleares e fatores de transcrição (Modiano & Breen, 2007).

De salientar que a sobreexpressão do oncogene HER-2 já foi observada em TMF (Millanta *et al.*, 2005), fornecendo ao tumor pelo menos um dos “hallmarks of cancer”: autossuficiência em fatores de crescimento (Zaczek, Brandt & Bielowski, 2005).

Como contraponto, temos mutações nos genes oncosuppressores, como o *p53*, que levam ao crescimento tumoral. De facto, o *p53* é classificado como “guardião do genoma”, devido à sua capacidade em reconhecer lesões no ADN, promovendo a apoptose (morte celular programada). Daqui pode resultar outro “hallmark of cancer”: a capacidade de evasão à apoptose; estão descritas mutações *missense* no gene *p53* em TMF (Mar *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2000; Nasir, Krasner, Argyle & Williams, 2000).

Se estas alterações não forem reparadas pelos mecanismos de homeostasia, há passagem para a fase de promoção tumoral, onde a célula tem capacidade de competir com as células vizinhas, levando ao desenvolvimento de uma massa (Modiano & Breen, 2007).

Por último, ocorre a fase de progressão tumoral, com invasão, destruição de tecidos e metastização. A invasão requer da célula tumoral alguma motilidade através da capacidade de digestão da matriz extracelular (ME) presente. Um tipo específico de proteases, as metaloproteases da matriz (MMP), está envolvido neste processo da digestão da ME. Recentemente, Akkoc, Inan e Sonmez (2012) detetaram a presença de MMP (especialmente MMP9 e MMP2) em TMF, o que poderá estar implicado na progressão e metastização rápidas deste tipo de tumor.

Conhece-se ainda um conjunto de moléculas responsáveis por impedir a invasão, visto promoverem a adesão celular. Neste caso, é possível destacar o papel das E-cadherinas e, de

acordo com Dias-Pereira e Gärtner (2003) e com Zappuli e colegas (2012), a expressão de E-cadherina encontra-se diminuída em TMF malignos e nas metástases. Ainda sobre as E-cadherinas (Peñafiel-Verdu *et al.*, 2012), verificou-se a manutenção da expressão de E-cadherinas em carcinomas mamários sem metástases, enquanto nos carcinomas mamários com metástases há perda dessa expressão, o que corrobora o seu papel no processo da metastização.

Adicionalmente, está também descrito um processo de transição epitélio-mesenquimal, que consiste na ocorrência de fenómenos bioquímicos na célula epitelial que permitem que esta assuma um fenótipo mesenquimal, que inclui a perda da sua polaridade e adesão, a capacidade de migração e invasão e a maior resistência à apoptose (Kalluri & Weinberg, 2009). Este fenómeno está descrito como ocorrendo em TM, especialmente em subtipos mais agressivos, como o subtipo basal (Sarrió *et al.*, 2008).

Na invasão tumoral, dá-se uma intravasão das células tumorais que, passando a membrana basal e as células endoteliais, penetram no lúmen dos vasos. Nos TMF sabe-se que a principal via de metastização é a via linfática (Raharison & Sautet, 2006). Depois, este êmbolo tumoral acaba por ficar aprisionado num vaso (devido ao seu tamanho) ou chega diretamente ao tecido alvo da metastização, geralmente através de moléculas específicas de adesão, como a laminina-V (Modiano & Breen, 2007).

No local de metastização ocorre angiogénese, promovida pelo VEGF (vascular endothelial growth factor - fator de crescimento vascular endotelial), e proliferação das células tumorais. Há também modulação do microambiente estromal em benefício do tumor pela produção de fatores de crescimento e ativação de vias de sinalização, para que as células tumorais cresçam no novo ambiente. Desta forma, o tumor encontra condições para ir progressivamente crescendo (Egeblad, Nakasone & Werb, 2010).

Ainda sobre a patogenia dos TM, especula-se que apenas uma parte de células tumorais (subpopulação), apelidadas de “*tumor initiating cells (TIC)*” ou “*cancer stem cells*”, sejam as responsáveis pela formação e progressão do tumor (Herman, Bhaskar, Cioffi & Heeschen, 2010). Estas células partilham algumas características com as células estaminais normais, como a autorrenovação e a pluripotência (Ailles & Weissman, 2007). A importância destas células prende-se com o facto de serem elas a perpetuar o tumor, e portanto, a terapêutica deve ser o mais dirigida a estas células possível.

2.4) Diagnóstico e terapêutica

Não é objetivo desta introdução deter-se em demasia acerca destes temas, de modo que o diagnóstico e a terapêutica serão abordados sucintamente.

Os sinais clínicos das gatas com TM são inespecíficos e por vezes inexistentes. Frequentemente, apresentam diminuição do peso, inapetência, letargia, intolerância ao exercício, dispneia e cianose (estas duas últimas, caso haja metástases pulmonares) (Misdorp, 2002).

Em termos terapêuticos, é possível mencionar-se a existência de:

- 2.4.1. Cirurgia

A cirurgia é a terapêutica de primeira escolha, com exceção dos TM em que está presente uma entidade inoperável, como o carcinoma inflamatório ou quando há metástases distantes. Pode ser combinado ou não com quimioterapia (Misdorp, 2002).

Como corolário das boas práticas cirúrgicas, deve ser feito um exame físico rigoroso, bem como análises pré-cirúrgicas (hemograma e bioquímicas para o perfil hepático e renal) que atestem o bom estado para se prosseguir com a anestesia. Deve ser feito o estudo radiológico da cavidade torácica e, eventualmente, ecografia abdominal para avaliar a presença de metástases (Peleteiro, 1994; Novosad, 2003).

Na história pregressa, deve incluir-se o maior número de informações sobre o tumor, nomeadamente: data do início da lesão; velocidade de crescimento; existência de prurido; se foram visíveis produtos de secreção; dados sobre o comportamento sexual do animal (data do último cio, se cio é regular, se teve pseudogestações, se teve partos ou se administrou regularmente progestagénios) (Peleteiro, 1994).

No exame físico deve proceder-se à palpação de todas as glândulas mamárias para aferir a existência de nódulos (quantos são e onde estão localizados), o tamanho dos mesmos, a sua consistência, se são ulcerados e se estão móveis ou fixos à pele ou parede abdominal. Deve também avaliar-se se existe deformação do mamilo e envolvimento dos linfonodos regionais – linfadenomegália (Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002). Contudo, a linfadenomegália não é uma apresentação clínica comum: os linfonodos podem estar normais mesmo na presença de células tumorais (Giménez *et al.*, 2010).

A remoção cirúrgica deve ser o mais precoce possível pois a massa vai aumentando de tamanho e fica mais difícil de remover com o tempo. A cirurgia pode ser uma nodulectomia (para massas pequenas - menores que 5 milímetros, firmes e não fixas), mastectomia parcial ou total, unilateral (uma só cadeia) ou bilateral (ambas os dois lados), consoante as glândulas envolvidas (Misdorp, 2002; Baba, 2007).

Contudo, como os TMF apresentam um grande nível de recidiva, são usados limites de ressecção menos conservadores que na cadela, optando-se à partida pela mastectomia unilateral (se o tumor está confinado só a um lado) ou bilateral (se tumor é afeta ambas as cadeias mamárias) (Misdorp, 2002; Novosad, 2003).

No caso da mastectomia bilateral ser a eleita, é conveniente retirar primeiro uma cadeia, aguardar duas semanas, e só depois retirar a outra (Moore & Olgivie, 2001).

Baba (2007) refere algumas regras que devem ser respeitadas aquando da cirurgia:

- Cumprir uma margem de 2 centímetros à volta do tumor;
- Vasos adjacentes ao tumor serem interrompidos antes da cirurgia, de forma a prevenir a difusão de êmbolos de células neoplásicas;
- Evitar seccionar o tumor ou a sua cápsula e, no caso de tal ser impossível, substituir de imediato os instrumentos cirúrgicos;
- Se tiver havido drenagem linfática para linfonodos adjacentes ao tumores, fazer a excisão destes.

De qualquer das formas, Misdorp (2002) recomenda que na exérese das glândulas mamárias caudais, os linfonodos inguinais superficiais sejam sempre removidos, uma vez que em 50% dos casos, aquando da cirurgia, já houve metastização de células tumorais para estes linfonodos. Já os linfonodos axilares apenas são removidos se houver suspeita clínica ou exame citológico positivo para células tumorais.

○ 2.4.2. Quimioterapia

Relativamente à quimioterapia, costuma-se administrar a doxorubicina (25 mg/m^2 , via endovenosa lenta, a cada 3 semanas) até cinco sessões (Ramsey, 2011). A doxorubicina pode ser prescrita na forma de monoterapia ou em conjunto com a ciclofosfamida ($50\text{-}100 \text{ mg/m}^2$, *per os*, no 3º, 4º, 5º e 6º dia após a doxorubicina). De facto, apesar das ténues evidências, quer uma, quer a outra forma de quimioterapia conseguem mostrar algum benefício em termos de regressão das dimensões do tumor e no período de sobrevivência (Novosad, Bergman & O'Brian, 2005). De salientar a cardiotoxicidade e a nefrotoxicidade potencial da doxorubicina em gatos (Ramsey, 2011).

○ 2.4.3. Anti-inflamatórios

Já foi identificada a sobreexpressão de COX-2 em TMF. Nesse sentido, tem-se vindo a investigar a utilização de inibidores seletivos de COX-2, como o piroxicam, na terapêutica de TMF, apesar dos resultados serem ainda pouco esclarecedores (Borrego, Castagna & Engel, 2009).

2.5) Gata como modelo comparativo

Tratando-se esta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, convém realçar que o Médico Veterinário tem um papel, senão primário, pelo menos muito importante, no desenvolvimento de conhecimento com o objetivo de impedir os processos patológicos nos

animais. Mas um Médico Veterinário no século XXI não pode descurar os recentes apelos de instituições internacionais, que advogam o conceito de “One Health”, e deve ter sempre em conta a capacidade de criar sinergias que possam trazer vantagens, não só aos animais, como também ao ser Humano.

Nesse âmbito, a espécie felina tem vindo a ser investigada como modelo comparativo para o estudo de TM na espécie Humana, especialmente nos TM hormono-independentes (Millanta *et al.*, 2005; Burrai *et al.*, 2010).

A confirmação de um modelo animal será de extrema importância, facilitando a realização de estudos sobre a patogenia dos TM, a elaboração de novas formulações terapêuticas e a análise de diferentes fatores no prognóstico (Misdorp, 2002).

As vantagens em usar a Gata como modelo biológico dos TM são, segundo Paoloni e Khanna (2008):

- Os TMF são espontâneos e heterogêneos, como os da Mulher (ao contrário dos TM de murinos, usados em investigação);
- As células de origem dos carcinomas mamários na mulher e na gata parecem ser semelhantes (Misdorp, 2002);
- Partilham fatores de risco ambientais semelhantes;
- Os gatos são imuno-competentes;
- Têm grandes amostras populacionais;
- Têm tempo médio de vida menores e tempos de progressão dos TM menores em relação à Mulher, o que permite tirar conclusões mais rapidamente;
- Incidência relativamente elevada (de Maria *et al.*, 2005);
- Grande cavidade corporal, em relação aos murinos (de Maria *et al.*, 2005).

As gatas têm uma distribuição específica de TM, possuindo mais frequentemente TM RE negativos (de las Mulas *et al.*, 2000), podendo vir a servir como modelo para TM da Mulher que sejam RE negativos, ou seja, hormono-independentes (Millanta *et al.*, 2005).

Contudo, deve sempre ter-se em conta, aquando da utilização da espécie felina como modelo para os TM da Mulher RE negativos, do impacto da OVH na incidência e subtipo molecular do TM da Gata (Hughes & Dobson, 2012).

3) Classificação dos tumores mamários

Tendo em conta a natureza complexa e heterogênea dos TMF, será de prever que existam formas variadas de os classificar. De facto, Misdorp (2002) considera poder classificar-se os TM usando métodos histopatológicos e prognósticos.

1.1. Classificação histopatológica

A classificação histopatológica (HP) dos TM é prática corrente em clínica, procedendo-se à análise da maioria dos tumores excisados. Também é possível fazer-se o diagnóstico dos TM por biópsia e por citologia (por aposição ou por PAAF) (Peleteiro, 1994).

Esta análise HP permite, segundo (Misdorp, Else, Hellmén & Lipscomb, 1999):

- Classificar a lesão e a sua malignidade;
- Observar a potencial infiltração dos tecidos envolventes (vasos, pele e restantes tecidos moles), pelo que as amostras de tecido devem englobar zonas tumorais, zonas de transição e zonas de tecidosãos (Peleteiro, 1994);
- Caracterizar a morfologia celular do tumor (pleomorfismo celular e nuclear, grau de diferenciação, índice mitótico, necrose, etc.).

Nesse contexto, pode usar-se uma escala baseada na escala do grau histológico aplicada aos TM da Mulher, de Elston & Ellis (1991), para classificar o grau histológico em TMF (Castagnaro *et al.*, 1998). Resumidamente, através do somatório da pontuação de três critérios, atribui-se uma pontuação final que define o grau de malignidade (I, II ou III). Assim, segundo Castagnaro *et al.* (1998) e Seixas *et al.* (2011) as três características que influenciam este sistema em TMF são:

- Formação de túbulos:
 - Um ponto se a formação tubular for muito evidente (formação tubular superior a 75%);
 - Dois pontos com formação tubular moderada (10 a 75% de túbulos);
 - Três pontos se são observados poucos túbulos (menos de 10% de túbulos).
- Índice mitótico (Jeglum, Guzman & Young, 1985):
 - Um ponto se figuras de mitose só muito raramente são visualizadas: 0-7 mitoses por 10 campos (objetiva de 40x);
 - Dois pontos se existem 8-14 figuras mitóticas, por 10 campos;
 - Três pontos se existem muitas (mais que 15) dessas figuras, por 10 campos.
- Características do núcleo/pleomorfismo celular (tamanho, coloração e forma irregular):
 - Um ponto quando temos um núcleo com tamanho, forma e coloração regular;
 - Dois pontos quando existe uma diferenciação moderada entre os vários núcleos em termos de tamanho (estão aumentados), forma e coloração. Podem observar-se nucléolos;
 - Três pontos se ocorrer extenso pleomorfismo, em que os núcleos têm formas e tamanhos bizarros, com nucléolos proeminentes ou múltiplos.

É então atribuído a cada um dos critérios uma pontuação e soma-se tudo, indo perfazer uma pontuação entre 3 e 9: se for entre 3 e 5, inclusive, corresponde ao grau I de malignidade (carcinoma bem diferenciado e menos maligno); se for 6 ou 7 é o grau II; se for 8 ou 9 é o grau III (pouco diferenciado e mais maligno, é o grau mais frequente em TMF, em 65%, segundo Costa, 2010).

De referir que este sistema só se aplica a carcinomas, não funcionando para sarcomas e carcinomas *in situ* (Peleteiro, 1994).

Mas ainda tendo como ponto de partida a análise HP realizada à massa tumoral, é possível classificar as neoplasias mamárias, emprestando-lhes um carácter mais descritivo, sem ter em conta fatores de prognóstico.

Assim, segundo Misdorp/WHO (1999), na espécie felina, é possível encontrar:

a) Tumores malignos:

- Carcinomas *in situ*/não infiltrativos: geralmente multicêntricos. São de tipo simples (linha celular única), não invadindo a membrana basal;
- Carcinoma túbulo-papilífero: com formação de túbulos, acompanhados ou não de papilas;
- Carcinoma sólido: na maioria estão mal definidos; com células dispostas em “lâminas”, “cordões” ou “ninhos”. Podem exibir células com citoplasma vacuolar, provavelmente de origem mioepitelial;
- Carcinoma cribiforme: mais comum em gatos, geralmente muito invasivo, é semelhante ao carcinoma sólido, mas com pequenas aberturas, como um crivo;
- Carcinoma anaplásico: raro no gato, é um tumor pouco definido. Infiltra-se de forma difusa e apresenta células grandes, pleomórficas e com núcleos de formas irregulares, ricos em cromatina. Podem haver células multinucleares, neutrófilos e eosinófilos. Tem um extenso estroma de colagénio. Com mau prognóstico, tem elevada recidiva e metastiza muito facilmente;
- Carcinoma das células escamosas: apresenta cordões e lâminas de células, com áreas de diferenciação escamosa (cornificações) e muitos neutrófilos;
- Carcinoma mucinoso: mostra grande produção de mucina. Pode ser simples ou complexo;
- Carcinossarcoma: é, normalmente, bem circunscrito e a superfície de corte é firme. Na sua composição celular estão englobadas células epitelióformes malignas (luminais ou mioepiteliais) e células semelhantes a elementos do tecido conjuntivo (sarcomas).
- Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno: tumores benignos com focos ou nódulos de células de aparência maligna (como, por exemplo, o osteossarcoma).

b) Tumores benignos:

- Adenoma:
 - Simples – Neoplasia com células luminas ou mioepiteliais, bem definidas;
 - Complexo – Células luminas e mioepitelioformes, geralmente encapsulado, sem necrose e com baixo número de mitoses.
- Fibroadenoma: com células epiteliais luminas e células fibroblásticas do estroma. Pode ser periductal ou intraductal e ter uma grande ou baixa celularidade.
- Tumor benigno misto: apresenta células epitelioformes (luminal e/ou mioepitelial) e células mesenquimatosas (produção de cartilagem, osso e/ou gordura) com tecido fibroso.
- Papiloma ductal: tumor ramificado ou lobular com células epiteliais e/ou mioepiteliais.

As formas mais frequentes de adenocarcinomas mamários na gata são a forma cribiforme (44%), a tubular (37,2%) e o carcinoma sólido (15,2%) (Costa, 2010).

1.2. Prognóstico

Prognóstico diz respeito ao evoluir da situação clínica, uma vez que é diagnosticada a afeção. O correto estabelecimento de um prognóstico tem extrema importância, uma vez que permite ao clínico saber como o TM irá evoluir, quanto tempo de vida terá o animal, como será a sua qualidade de vida e como poderá reagir à terapêutica (Seixas *et al.*, 2011).

A classificação do prognóstico nos TMF é atribuída, geralmente, pelo sistema TNM (Seixas *et al.*, 2011).

Muitos outros fatores de prognóstico têm vindo a ser investigados, uns com valor e utilidade bem definidos, outros a carecerem de mais investigação e outros, ainda, a começarem agora a ser desvendados. Para ser mais compreensível durante a leitura, proceder-se-á à descrição sumária de cada um dos fatores de prognóstico reconhecidos nos TMF:

- Sistema TNM: este sistema (ver figura 4), que usa critérios clínicos, foi baseado no sistema TNM para tumores malignos humanos, da WHO (Owen, 1980). O sistema TNM para a espécie felina (Lana *et al.*, 2007) tem por base o tamanho do tumor primário (T), a existência de metástases nos linfonodos regionais (N), ou noutros órgãos distantes (M). Esta forma de estadiamento

Box 26-4

Staging of Feline
Mammary Tumors

Modified system

T—Primary tumor

T ₁	<2 cm maximum diameter
T ₂	2-3 cm maximum diameter
T ₃	>3 cm maximum diameter

N—Regional lymph nodes

N ₀	No histologic/cytologic metastasis
N ₁	Histologic/cytologic metastasis

M—Distant metastasis

M ₀	No evidence of metastasis
M ₁	Evidence of metastasis

Stages

I:	T ₁	N ₀	M ₀
II:	T ₂	N ₀	M ₀
III:	T _{1,2}	N ₁	M ₀
	T ₃	N _{0,1}	M ₀
IV:	Any T	Any N ₁	M ₀

Modified from Owen LN: Classification of tumors in domestic animals, Geneva, 1980, World Health Organization.

Figura 4 – Tabela com o modo de classificação do sistema TNM em TMF (extraído de Lana *et al.*, 2007)

está associada ao tempo livre de doença (DFS - disease free survival), um indicador de avaliação do prognóstico (Seixas *et al.*, 2011);

- Critério estadiamento histológico modificado de “Elston & Ellis, 1991”, já referido anteriormente. Quanto maior for o grau histológico, maior é o índice mitótico e a proliferação celular, e pior é o prognóstico (Seixas *et al.*, 2011). De salientar que o tipo III está associado significativamente a menores taxas de sobrevivência total (OS-overall survival) e DFS. Um ano após a cirurgia, a recidiva dos TMF com grau III é de 94%, de 50% para os TM com II, e de 0% para animais com I (Seixas *et al.*, 2011). Desta forma se compreende que o grau histológico possa ser usado como fator de prognóstico independente e muito significativo (Seixas *et al.*, 2011);
- Índice mitótico: está correlacionado com OS, em que gatos com TM que apresentam menos de 2 figuras mitóticas por campo mostram maior OS (Preziosi, Sarli, Benazzi, Mandriola & Marcato, 2002);
- Extensão da intervenção cirúrgica: cirurgia radical (mastectomia completa) relaciona-se, significativamente, com um maior DFS em comparação com cirurgias conservadoras, apesar do OS não ter aumentado (MacEwen *et al.*, 1984);
- Marcadores de proliferação (Hughes & Dobson, 2012):
 - Ki67: é uma proteína nuclear, só expressa por células em fase de divisão, sendo por isso usada no prognóstico de TMF; quanto maior for o índice Ki67, pior é o prognóstico (Seixas *et al.*, 2011). Também parece correlacionar-se com TMF RE negativos e que sobreexpressam HER-2 (Yerushalmi *et al.*, 2010);
 - PCNA (proliferating cell nuclear Ag): envolvido na reparação do ADN, mostra expressão máxima nas fases G1 e S do ciclo celular. Encontra-se mais sobreexpresso em carcinoma malignos do que em TMF benignos, com impacto no prognóstico (Preziosi, Sarli, Benazzi & Marcato, 1995);
 - AgNOR (interphase argynophilic nucleolar organiser regions): associadas aos componentes nucleolares envolvidos na transcrição de ARN e no seu processamento. O tamanho e o número destas regiões correlacionam-se com a proliferação celular e, dessa forma, com o prognóstico em gatos (Derenzini *et al.*, 2000; Preziosi *et al.*, 2002);
- RE/RP: não correlacionado com OS nem com parâmetros histológicos, apesar de RE negativos apresentarem pior prognóstico (Millanta *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2006);
- Sobreexpressão HER-2: relacionada com um menor OS (Millanta *et al.*, 2005). Contudo, Rasotto, Caliari, Castagnaro, Zanetti e Zappuli, (2011), referem que a sobreexpressão de HER-2 terá pouca expressão nos TMF (5,5%) e que não se relaciona com o tipo

histológico nem o com DFS, pelo que este biomarcador poderá não ter um papel tão primário no prognóstico como se julgava;

- STAT (signal transducers and activators of transcription - transdutores de sinal e ativadores da transcrição): esta família de genes codifica para fatores de transcrição e tem vindo a ser implicada no desenvolvimento de TM (Hughes & Dobson, 2012). TMF com marcação nuclear para STAT mostram maior grau histológico de malignidade, menor formação tubular e maior índice mitótico, apesar do seu papel no prognóstico ainda carecer de mais investigações (Petterino *et al.*, 2007);
- RON (macrophage-stimulating protein receptor, recetor proteico estimulador de macrófagos): é um membro da família de recetores de tirosina quinase (TQ), que estimula a invasão de células cancerígenas e que está sobreexpresso em 20% dos TMF (de Maria *et al.*, 2002);
- Topoisomerase II β : interage com DNA polimerase na replicação do ADN. Segundo Morris *et al.* (2008), a sua expressão está positivamente correlacionada com o grau de malignidade tumoral;
- Ciclinas: são proteínas que regulam o ciclo celular. Sabe-se que a sobreexpressão em adenocarcinomas mamários felinos chega a ser na ordem dos 48,6% e que está relacionada com a progressão do TM (Murakami *et al.*, 2000);
- Mutação *p53*: mutações neste gene são um fator independente de prognóstico, no cancro da Mama, na Mulher, com diminuição da OS (Pharoah, Day & Caldas, 1999). Vários estudos reportam mutações *p53* em carcinomas mamários do gato (Murakami *et al.*, 2000; Nasir *et al.*, 2000);
- VEGF: é um fator angiogénico com importância no crescimento de TM. Millanta e colegas (2002) mostraram haver uma correlação positiva entre a maior percentagem de células marcadas para VEGF por IHQ e o pior prognóstico (com menor OS);
- COX (ciclooxigenase): está envolvida na síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidónico. A expressão de uma das suas isoformas – COX-2 – foi investigada num estudo em TMF (Millanta *et al.*, 2006) que mostrou ter valor como fator de prognóstico, uma vez que nos TMF com sobreexpressão de COX-2, o prognóstico era pior. Adicionalmente, a sobreexpressão de COX-2 mostrou correlação positiva com TMF RE negativos, RP positivos, com sobreexpressão de HER-2 (o HER-2 parece regular a expressão nuclear da COX-2, segundo Wang *et al.*, 2004) e com atividade angiogénica;
- Akt: é uma proteína quinase B, ativada pela via PI3K (uma via de sinalização celular ativada pelo HER-2), que promove o crescimento celular, a proliferação, a migração e a

sobrevivência celular (Tokunaga *et al.*, 2006). Foi, recentemente, associada a graus de malignidade elevados e a DFS reduzidos na Gata (Maniscalco *et al.*, 2012);

- PTEN (phosphatase and tensin homologues): é um oncosupressor, regulador negativo da Akt. OS TM PTEN-negativos têm pior prognóstico na Gata (Ressel, Millanta, Caleri, Innocenti & Poli, 2009);
- Subtipos moleculares de TM: diferentes subtipos (tema desenvolvido mais adiante) têm prognósticos diferentes na Mulher e na Cadela, só existindo um estudo deste género para a Gata (Brunetti *et al.*, 2012). Os TMF *basal-like* têm um menor OS relativamente aos outros subtipos, inclusive menor que o HER-2 (que também tem mau prognóstico). Os TMF luminais são os com melhor prognóstico;
- Tamanho do tumor: segundo MacEwen *et al.* (1984), o tamanho tumoral é um dos fatores mais importantes, pois se for menor que 8 cm³ tem maior DFS e OS, comparativamente aos tumores maiores que 8 cm³; O diâmetro também é um fator de prognóstico independente, piorando com o tamanho (Weyes & Hart, 1983) em que TM cujo diâmetro é menor que 3 cm têm maior tempo de sobrevida médio (21 meses) em relação a TM maiores que 3 cm (12 meses) (Jodi, Myers, Singh & Simko, 2002);
- Idade: quanto mais velho pior, o prognóstico (Weyes & Hart, 1983).

1.3. Classificação molecular

Como já foi referido, o TM é uma entidade clínica muito heterogénea e complexa, englobando formas com características biológicas, apresentações clínicas e respostas à terapêutica diferentes (Weigelt, Geyer & Reis-Filho, 2010).

Devido a este facto, os sistemas classificativos baseados na análise HP, ainda que associados ao prognóstico (Geyer, Reis-Filho & Marchio, 2009), revelam-se insuficientes, pois é frequente que tumores com características HP semelhantes se comportem clinicamente de forma diferente ao longo do tempo, com respostas diferentes a terapêuticas iguais (Colombo, Milanez, Weigelt & Reis-Filho, 2011). De facto, cerca de 15% das pacientes humanas cujas características HP do TM indicam bom prognóstico, desenvolvem metástases e morrem enquanto outros que foram classificados como tendo mau prognóstico, vieram a ter um bom desenlace clínico (Gown, 2009). Estas observações e outras indicantes vieram demonstrar que a análise HP não consegue caracterizar corretamente todos os TM.

Adicionalmente, as características avaliadas para a fenotipagem tradicional por HP (como, por exemplo, o índice mitótico e a aneuploidia) têm baixa capacidade para prever quais as respostas às diferentes terapêuticas disponíveis (Geyer *et al.*, 2009). Mesmo em Medicina Humana, com a abordagem tradicional (HP mais os 3 marcadores, RE, RP, HER-2), 60% dos

pacientes recebem alguma forma de quimioterapia, apesar de apenas 15% terem benefícios clínicos, enquanto todos os outros são expostos à sua toxicidade (Reis-Filho & Pusztai, 2011). A resposta à terapêutica não é determinada exclusivamente por fatores prognósticos anatomo-clínicos (como o tamanho do tumor ou o envolvimento de linfonodos), mas principalmente pelas características moleculares intrínsecas do tumor. Assim, a classificação molecular dos TM tem vindo a revelar-se de uma importância extrema (Weigelt, Baehner & Reis-Filho, 2010).

De facto, as mais recentes técnicas de biologia molecular trouxeram à luz da investigação oncológica um novo paradigma classificativo, agrupando os TM tendo por base uma análise *hierarchical clustering*, obtida através de técnicas de *microarray* (Geyer *et al.*, 2009). A informação daí obtida corroborou, verdadeiramente, a natureza diversa e heterogénea dos TM da Mulher (Weigelt *et al.*, 2010; Reis-Filho *et al.*, 2011). Com base nos resultados obtidos, uma nova taxonomia tem levado ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, mais específicas e tem permitido obter um valor preditivo das respostas terapêuticas relativamente aos fármacos usados (Nagasaki & Miki, 2006).

Desta forma, no futuro, poder-se-á assistir à implementação de esquemas terapêuticos multimodais com base na análise molecular, podendo aumentar a taxa de sobrevivência em pacientes com TMF (Brunetti *et al.*, 2012).

As técnicas que mais têm contribuído para a formação deste novo sistema de classificação são:

- Imunohistoquímica (IHQ): usada rotineiramente nos dias de hoje, permite avaliar a expressão dos RE, RP, HER-2, de vários citoqueratinas (CK) e de marcadores de proliferação (Ki-67);
- “DNA *microarray*”: técnica que permite analisar os perfis transcricionais de centenas/milhares de genes, baseada na hibridização dos ácidos nucleídos (Malinowiki, 2007), permitindo identificar o perfil de expressão génica (Nagasaki & Miki, 2006). Essas técnicas de *microarray* muitas vezes usam cerca de 70 alvos génicos, como o teste comercial Mammaprint[®] (Colombo *et al.*, 2011). Fica patente com esta técnica, a grande diversidade dos TM a nível molecular (Reis-Filho & Pusztai, 2011).

Os primeiros trabalhos começaram por mostrar que os TM podiam ser RE-negativos ou RE-positivos, e que os TM pertencentes a cada um destes grupos seriam uma doença diferente em termos moleculares (Perou *et al.*, 2000). A partir daí, realizaram-se análises *hierarchical cluster* dos genes que mais variavam entre os vários TM do que entre amostras repetidas do mesmo tumor. Esses genes, que foram apelidados de genes intrínsecos, revelaram a

existência, primeiro, de 4 grupos (luminal, sobreexpressão HER-2, *basal-like* e *normal-like*) (Perou *et al.*, 2000) e depois de 5 grupos (luminal A, luminal B, *basal-like*, *normal-like* e sobreexpressão HER-2¹) (Sørli *et al.*, 2001). Mais recentemente, têm vindo a ser referidos mais outros 3 subtipos, ainda não completamente estabelecidos nem aceites (Prat *et al.*, 2010). Esta nova taxonomia, baseada nos padrões de expressão de uma série de genes intrínsecos, veio então revolucionar a maneira como percecionamos os TM (Strehl, Wachter, Fasching, Beckman & Hartmann, 2011), primeiro na espécie Humana e só agora, mais recentemente, vem dando os primeiros passos em Medicina Veterinária.

Os subtipos moleculares descritos para a espécie humana são:

- Luminal (A e B): apresentam sobreexpressão dos RE; são os que têm melhor prognóstico, respondendo à terapêutica hormonal, apesar de a sensibilidade à quimioterapia ser limitada; Brunetti *et al.* (2012) atribuíram-lhes uma baixa frequência nos TMF.
 - Luminal A: é o subtipo que mostra maior expressão dos RE. É de todos o com menor risco de recidiva e melhor prognóstico;
 - Luminal B: A expressão de RE é menor que no luminal A. Pode mostrar sobreexpressão de HER-2 e maior grau de proliferação celular que o subtipo luminal A, tendo, por isso, pior prognóstico, apesar de responder menos apropriadamente à terapêutica hormonal (Perou *et al.*, 2000; Sørli *et al.*, 2001; Morris & Carey, 2007).
- Sobreexpressão de HER-2 (HER-2 positivos): os tumores deste tipo possuem amplificação do oncogene e/ou sobreexpressão da proteína HER-2, acompanhada da ausência de expressão dos genes característicos do subtipo luminal. Segundo estudos de FISH e IHQ representam cerca de 15-30% dos TM na Mulher (Slamon *et al.*, 1989). É de salientar que nem todos os TM diagnosticados HER2-positivos por IHQ/FISH são classificados como tal através da análise do seu perfil molecular e vice-versa (Colombo *et al.*, 2011), não estando claro se é a subtipificação molecular ou a classificação por IHQ/FISH que garante a melhor exatidão na sua classificação (Parker *et al.*, 2009; de Ronde *et al.*, 2010; Weigelle *et al.*, 2010; Brunetti *et al.*, 2012).
- *Basal-like*: a técnica de “DNA microarray” é mais fiável para o seu diagnóstico, comparativamente à imunofenotipagem por IHQ. Este subtipo, presente em 15% dos TM da Mulher, é caracterizado pela expressão de citoqueratinas (CK 5/6, 14, 17) normalmente expressas nas células basais do tecido epitelial normal da glândula mamária, de laminina, de “fatty acid binding protein 7”, de EGFR, p-cadherina, de vimentina e das caveolinas 1 e 2. Adicionalmente, tem uma elevada expressão de elementos proliferativos, não

¹ Como se mencionará muitas vezes o termo TM com sobreexpressão de HER-2, abreviar-se-á, doravante, HER-2+

mostrando expressão dos RE e RP, nem sobreexpressão de HER-2, apesar de expressar *p53* e mutação em TP53 (protein tumor 53). Este subtipo é caracterizado por um grau histológico elevado, com elevado índice mitótico, zonas de necrose central, *pushing borders*, infiltração linfocítica e, por vezes, elementos metaplásicos – metaplasia escamosa e produção de matriz. Os TM deste subtipo partilham características moleculares com as células mioepiteliais. Tem muitas semelhanças (histológicas e moleculares) com os tumores hereditários ligados a mutações em BRCA1 (Turner & Reis-Filho, 2006). É, de todos os subtipos, o que tem pior prognóstico (menores OS e DFS) (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2004; Rouzier *et al.*, 2005; Honrado *et al.*, 2006; Turner & Reis-Filho, 2006; Livasy *et al.*, 2006; Pepercorn, Perou & Carney, 2008).

- *Normal-like*: este subtipo é muitas vezes referido como sendo um artefacto, resultante da análise de tumores com um alto conteúdo de células epiteliais e de estroma glandular normal, uma vez que o perfil genético engloba, não só as células tumorais, mas também reação peri-tumoral. Curiosamente, os TM deste subtipo sobreexpressam genes que estão habitualmente expressos no tecido adiposo e noutros tecidos não epiteliais. Tem, ainda, elevada expressão de genes do epitélio basal e subexpressão de genes do epitélio luminal (Sørlie *et al.*, 2001; Strehl *et al.*, 2011).
- *Claudin-low*: tem baixa expressão dos genes envolvidos nas *tight junctions* e noutras estruturas especializadas de adesão intercelular. Também é, como o *basal-like*, negativo para RE, RP e HER-2, apesar de não ter expressão de CK 5/6, nem do EGFR; o seu perfil de expressão génica é semelhante ao das células tronco mamárias. Certos autores põem em causa se o *claudin-low* é um subtipo próprio ou se se deve incluir nos *basal-like* (Prat *et al.*, 2010; Strehl *et al.*, 2011).
- Apócrino: negativo para os RE e recetores de androgénio, mas com morfologia apócrina (Farmer *et al.*, 2005).
- *Interferon-rich*: caracterizado pela elevada expressão de genes regulados pelo interferão, como o STAT1; também é negativo para os RE (Hu *et al.*, 2006).

Uma vez que os três últimos subtipos ainda não são totalmente aceites pela comunidade científica foi apenas realizada a sua descrição sumária.

De salientar que a determinação do perfil molecular de TM pela técnica de *microarray* demora muito tempo, é caro e requer laboratórios com condições muito standardizadas. Não é, portanto, um método expedito, do ponto de vista clínico (Strehl *et al.*, 2012). Assim, é importante saber se a subtipificação pode ser identificada pela imunofenotipagem (IHQ) de

forma a englobar os vários subtipos. Através da técnica de IHQ, é possível identificar o subtipo luminal (RE+ e/ou RP + e CK 8/18+), diferenciar o luminal A do luminal B (com expressão de HER-2 e maior proliferação - Ki67); a marcação para CK 5/6, CK 14 e/ou EGFR, ajuda a definir o subtipo *basal-like* (RE-, RP- e HER2-, CK 5/16+ e/ou CK14+ e/ou EGFR+) (Nielsen *et al.*, 2004). A imunomarcação para HER-2 (RE-, RP-, HER2+ e qualquer marcação com CK) permite classificar os TM HER-2+. Por último, uma marcação negativa em todos os marcadores define o triplo-negativo. (Cheang *et al.*, 2008; Sassi, Benazzi, Castellani & Sarli, 2010). De referir que o triplo-negativo é o subtipo mais agressivo, com elevada metastização distante e com pior prognóstico (Dent *et al.*, 2007).

Brunetti e colegas (2012), em estudos de IHQ, só detetaram 3 subtipos em TMF: luminal B, *basal-like* e HER-2+.

No fundo, é de salientar que os testes moleculares ainda só devem servir de complemento à imunofenotipagem mais tradicional (Rakha *et al.*, 2010).

4) Tumores mamários HER-2 positivos

Após o enquadramento geral dos TMF, onde esta patologia foi contextualizada, é, pois, chegada a vez de convergir a atenção num subtipo particular de TM: TM com sobreexpressão de HER-2 (HER-2+), tema sobre o qual versa este trabalho.

Este subtipo caracteriza-se por uma amplificação do oncogene HER-2 (ou *erb-B2*) e/ou sobreexpressão da respetiva proteína, um recetor de fator de crescimento epidérmico, da família EGFR (epidermal growth factor receptor), presente na membrana celular das células epiteliais (Yarden, 2001). De seguida, será descrita, de modo breve, a família dos EGFR/HER.

4.1. Família HER

O HER-2 pertence então à família dos EGFRs, uma família de recetores de tirosina quinase (TQ) (Robinson, Wu & Liu, 2000). Esta família tem 4 elementos (ver figura 5): HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4 (Wieduwilt & Moasser, 2008). Como fatores de crescimento que são, têm importantes funções na biologia do desenvolvimento e na fisiologia do organismo, funções essas, na maioria das vezes, descobertas em estudos com ratos *knock-out* para cada recetor (Olayioye, Neve, Lane & Hynes, 2000); designadamente, funções na proliferação celular, na regulação da apoptose, no rearranjo do citosqueleto, na diferenciação e migração celular (pele, SNC, pulmões, glândula mamária, fígado, tubo digestivo, rim, placenta, palato, face, etc.) (Miettinen *et al.*, 1999; Olayioye *et al.*, 2000; Roskoski, 2004).

Entre os 4 membros deste grupo, apesar de algumas diferenças, há uma estrutura modular comum, que se traduz numa cadeia glicoproteica transmembranar (Wieduwilt & Moasser, 2008):

- com um domínio extracelular (DEC), glicosilado, constituído por 4 subdomínios: I ou L1 (“leucine-rich” ou rico em leucina), II ou CR1 (“cysteine-rich” - rico em cisteína), L2 ou III e CR2 ou IV. O subdomínio CR1 projeta um “ β -hairpin loop” essencial para a formação do “braço de dimerização” (Lax *et al* 1989; Bazley & Gullick, 2005);
- com um domínio transmembranário (Fleishman, Schlessinger & Ben-Tal, 2002);
- e um domínio intracelular (DIC) ou citoplasmático. Neste domínio podemos encontrar um pequeno subdomínio justamembranário, um sub-domínio referente à atividade de TQ e, por último, um subdomínio carboxo-terminal, com uma tirosina no centro ativo. Este DIC apresenta-se bilobado, com dois lobos C-terminal e N-terminal, colocando-se o sítio de ligação ao ATP entre esses lobos (Wieduwilt & Moasser, 2008). A atividade de quinase ocorre quando o lobo C de uma quinase se junta com lobo N da quinase do segundo recetor (Zhang *et al.*, 2006).

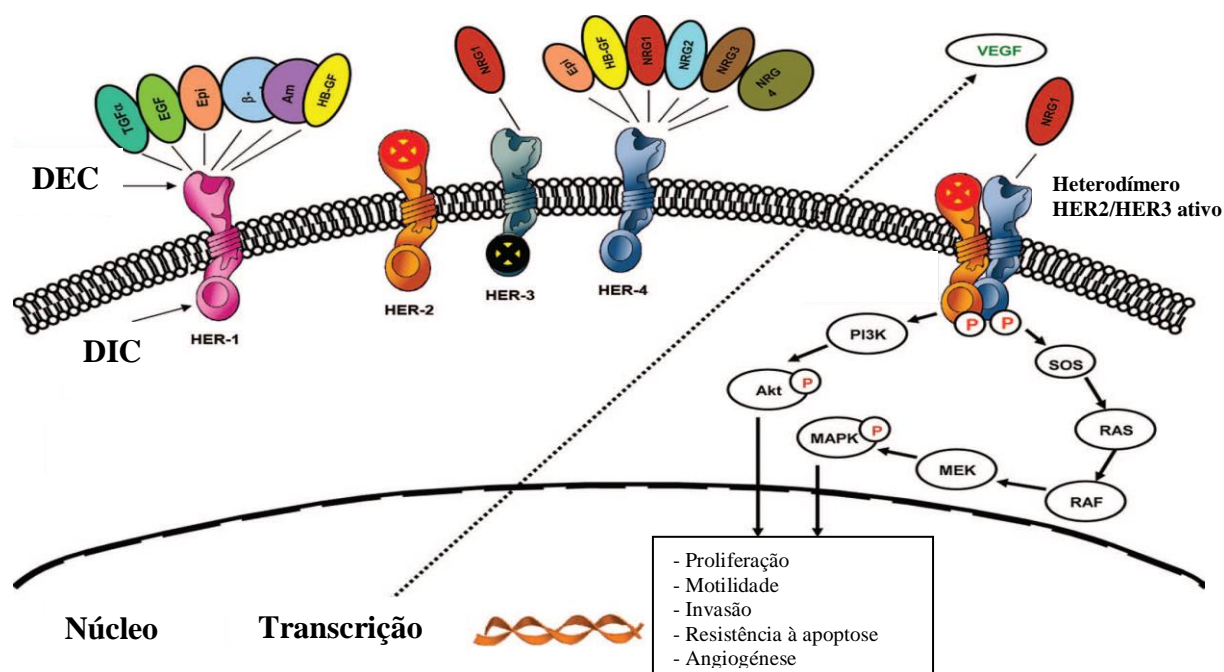


Figura 5 – Vários elementos da família EGFR e vias da cascata de sinalização celular por eles ativadas, nomeadamente pelo HER-2 (adaptado de Ross *et al.*, 2009).

De um modo genérico, a ativação da família HER acontece através da ligação de pequenas moléculas, chamadas ligandos (Akiyama *et al.*, 1988) ao sítio de ligação próprio no DEC (L1 e L2). Em termos de ligandos, estão, até hoje, definidos 13 possíveis ligandos (ver figura 5): EGF, TGF, HB-EGF, beta-celulano, anfiregulina, epiregulina, epigênio e várias neuroregulinas (NRG 1, 2, 3, 4, 5 e 6) (Olayioye *et al.*, 2000).

No geral, os ligandos são sintetizados como precursores transmembranários glicosilados e que depois podem ser clivados proteoliticamente por proteases e metaloproteases, originando fatores de crescimento maduros (Brown, Meire, Plowman, Coffey & Dempsey, 1998; Roskoski, 2004).

Os ligandos desta família geralmente atuam localmente, como fatores de crescimento autócrinos ou parácrinos. Assim, a disponibilidade de um ligando num determinado tecido regula a transdução do sinal, havendo, ainda, padrões de expressão diferentes consoante o órgão e o estadio de desenvolvimento (Olayioye *et al.*, 2000).

Na ausência de ligandos, o recetor fica na forma inativa e o DEC assume uma conformação “tethered”/amarrada, em que o “ β -hairpin loop” do CR1/II está inclinado sobre o CR2/IV, escondendo o “braço de dimerização” (Bouyain, Longo, Li, Ferguson & Leahy, 2005).

Quando o ligando/fator de crescimento se liga através dos domínios L1/I e L2/III do DEC (Burgess *et al.*, 2003), induz alterações na conformação do recetor, através de uma rotação de 120° (Fleishman *et al.*, 2002). Este rearranjo conformacional quebra o *tether* intramolecular entre os subdomínios II e IV, deixando o “braço de dimerização” exposto. Isso vai permitir que dois recetores vizinhos, membros da família de EGFR, possam emparelhar, através de interações intermoleculares homofílicas entre os “braços de dimerização” (Bazley & Gullick, 2005), ou seja, dimerizam, formando homodímeros (se são dois membros iguais, por exemplo HER-1/HER-1) ou heterodímeros (se forem dois membros diferentes, por exemplo, HER-3/HER-2) (Wieduwilt & Moasser, 2008). Os dímeros têm maior estabilidade e a ligação aos ligandos tem maior afinidade, comparativamente ao estado monomérico (Yarden & Schlessinger, 1987). No entanto, o normal é haver cerca de 95% de moléculas HER com conformação inativa e apenas 5% com conformação aberta (Burgess *et al.*, 2003).

Esta família de quatro recetores tem, pois, capacidade de formar 10 complexos dimerizantes diferentes: 4 homodímeros e 6 heterodímeros, o que acrescenta à vasta pluralidade de ligandos, ilustra bem as várias vias de sinalização que os recetores conseguem subscrever. De facto, cada ligando promove uma resposta celular diferente (Eccles, 2011). Além disso, esta complexidade de vias surgiu tardiamente na evolução, uma vez que os invertebrados só têm um recetor do tipo de EGFR (Perrimon & Perkins, 1997; Harari & Yarden, 2000). Adicionalmente, os heterodímeros traduzem uma vantagem biológica, expandindo o leque de ligandos que podem ativar o recetor e diversificando as vias de sinalização que podem desencadear (Olayioye *et al.*, 2000; Roskoski, 2004), uma vez que os recetores adquirem diferentes propriedades sinalizadoras, consoante a composição dos dímeros (Graus-Porta, Beerli, Daly & Hynes, 1997). Na verdade, há ativação de fenómenos únicos só atingíveis

através de heterodímeros, nomeadamente, nos processos de desenvolvimento cardíaco e do sistema nervoso (Olayioye *et al.*, 2000).

Apesar de ocorrer a formação de homodímeros, a formação heterodímeros é mais frequente. Na verdade, no caso de HER-2 e HER-3, a heterodimerização é quase um pré-requisito para que a transdução do sinal se possa processar (Harari & Yarden, 2000), uma vez que o HER-2 não tem ligandos conhecidos, funcionando como corrector de outros membros de forma cooperativa (Klapper *et al.*, 1999) e o HER-3, apesar de se ligar a muitos ligandos com alta afinidade, tem atividade de TQ fraca (Carraway & Cantley, 1994; Harari & Yarden, 2000).

Não obstante, em termos de crescimento e transformação celular, o heterodímero mais potente é o HER-2/HER-3 (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996), com a maior estabilidade de ligação e uma interação potente com os ligandos, em que o HER-3 é fosforilado pelo HER-2 e os resíduos de fosfotirosina no C-terminal podem ser fosforilados para interagir com segundos mensageiros (Tzahar *et al.*, 1996; Yarden, 2001).

A dimerização do recetor é um passo essencial para a ativação da atividade de TQ, que despoleta a autofosforilação dos resíduos de tirosina do domínio citoplasmático, que irão servir de locais de ligação para recrutar moléculas sinalizadoras (segundos mensageiros), que ao interagirem com os recetores levam os sinais recebidos ao núcleo, ativando as vias biológicas de sinalização (Olayioye *et al.*, 2000; Bazley & Gullick, 2005). Estas vias são, então, mediadas por vários componentes, como uma *network* (Citri *et al.*, 2003), sendo responsáveis pela comunicação do sinal célula-células ou célula-estroma (Ross *et al.*, 2004) e promovendo a sobrevivência celular, a progressão do ciclo celular, a proliferação celular, a transcrição de genes e a organização do citosqueleto (Atalay, Cardoso, Awado & Piccart, 2003).

As vias de transdução ativadas são: Ras/MAPK² (regula a proliferação celular); PI3K/Akt³ (sobrevivência da célula e progressão do ciclo celular); PLCY/PKC⁴ (sobrevivência celular); STAT⁵ (regula a transcrição de genes) e “Par-6 atypical PKC”⁶ (organizador epitelial) (Prenzel *et al.*, 2001; Atalay *et al.*, 2003; Bazley & Gullick, 2005).

Os membros da família EGFR/HER estão implicados em várias doenças, especialmente por sobreexpressão dos seus recetores, como na psoríase, lepra, Doença de Alzheimer e no cancro (Wieduwilt & Moasser, 2008). No cancro há, por assim dizer, uma ativação anormal destes recetores, originada por uma sobreexpressão/amplificação ou mutação (Zwick, Wallasch & Ullrich, 2000; Roskoski, 2004).

² Ras/MAPK – mitogen activated protein kinase (Proteína quinase mitogénica ativada)

³ PI3K/Akt – Phosphatidylinositol-3 kinase (fosfatidilinositol 3-quinase) que ativa Akt (proteína quinase B)

⁴ PLCY/PKC – proteína quinase C

⁵ STAT – signal transducers and activation of transcript (transdutores de sinal e ativação do transcrito)

⁶ Par-6 atypical/PKC – Partitioning-defective Protein 6/ Protein kinase C (proteína quinase atípica Par-6)

Podem ocorrer mutações no HER-1, com deleção do DEC ou do DIC, que causem a ativação da atividade de TQ de forma constitutiva (independente do ligando) (Voldborg, Damstrup, Spang-Thomsen & Poulsen, 1997). Estão também descritas mutações em HER-2 (como deleções no DEC, causando ativação constitutiva do recetor ou mutações pontuais do DTM, que aumentam a fosforilação da tirosina do centro ativo), mas apenas em ratos (Prenzel *et al.*, 2001). Nos ratos (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769), o homólogo de HER-2, o oncogene *neu*, requer a ativação por mutação para gerar tumorigênese, bastante diferente dos humanos, onde basta apenas haver sobreexpressão (Moasser, 2007).

Além da sua função na membrana celular, já referida, os membros da família HER também se podem deslocar para o núcleo, intervindo na transcrição de genes com especial importância nos TM, onde há uma sobre-regulação de muitos genes com implicações na biologia do tumor: ciclina D1, COX-2, via iNOS/NO, etc. (Massie & Mills, 2006; Wieduwilt & Moasser, 2008).

Na verdade, a autossuficiência em fatores de crescimento é um dos “hallmarks of cancer”. Nesse sentido, é preciso um controlo apertado na regulação destes recetores, para não haver um desequilíbrio que tenda para a proliferação celular e sobrevivência exageradas (Wieduwilt & Moasser, 2008). São vários os mecanismos de controlo ou atenuação que podem ser referidos (Ceresa & Schmid, 2000; Citri *et al.*, 2004; Bazley & Gullick, 2005; Nicholson *et al.*, 2005; Pick *et al.*, 2007; Wieduwilt & Moasser, 2008; Yarden, 2011):

- a desfosforilação da tirosina por fosfatases que reduz os locais de ligação das proteínas sinalizadoras;
- a internalização induzida por ligandos aos recetores ativados, havendo separação física entre os recetores e os ligandos, reciclagem do recetor e seu regresso à superfície celular ou transporte do recetor com o ligando para o lisossoma e posterior degradação;
- a presença de atenuadores de sinal (como o SOCS5 - supressor of cytokine signaling 5, que se associa com o EGFR, inibindo o seu potencial mitogénico);
- a HSP90 (heat shock protein 90), que se liga ao domínio TQ do HER-2, estabilizando-o e diminuindo a sua atividade de TQ e a formação de heterodímeros (de salientar, contudo, a existência paradoxal de estudos que relacionam altos níveis de expressão de HSP90 com TM de pior prognóstico);
- A existência de uma isoforma de HER-2, apelidada de Herstatina, fruto de *alternative splicing* no intrão 8, que codifica para uma proteína de 68 kDa (com subdomínio I, II e parte do domínio III do DEC) com efeitos inibitórios no HER-2. Este produto liga-se com alta afinidade ao HER-2 *full-length* (ao domínio II de DEC), inibindo a sua dimerização,

causando *down-regulation* e degradação do recetor. Esta variante da proteína está ausente em 75% dos carcinomas mamários na Mulher (Doherty *et al.*, 1999; Koletsa *et al.*, 2008).

De seguida, serão tecidas algumas considerações acerca de cada membro da família:

- HER-1 ou EGFR: foi o primeiro recetor com atividade TQ a ser descoberto (Carpenter, King & Cohen, 1978). O gene encontra-se no cromossoma 7p12 e a proteína correspondente tem 1210 aminoácidos (aa) e pesa 134 Kilodalton (kDa) na espécie humana (Ullrich *et al.*, 1984; Rafkumar & Gullick, 1994). Nos gatos, pensa-se que a sequência génica tenha 4480 pares de bases, esteja localizada no cromossoma A2 e a proteína tenha 1405 aa (GenBank, 2013). Também designado Erb-B1, nome transposto do oncogene V-erbB, do vírus do eritroblastoma aviário, devido à descoberta da elevada homologia entre este gene viral e o gene que codificava para o EGFR em humanos (Yarden, 2001; Roskoski, 2004). Em termos fisiológicos, tem ação no desenvolvimento dos folículos pilosos, dos olhos, do sistema nervoso (células de Schwann e gânglios nervosos), do aparelho digestivo (principalmente no intestino), na lactogénese e na mamogénese (crescimento dos ductos mamários - Olayioye *et al.*, 2000) bem como na diferenciação, migração, cicatrização e na apoptose celular (Luetkeke *et al.*, 1999; Bazley & Gullick, 2005; Wieduwilt & Moasser, 2008). Encontra-se sobreexpresso em cancros da bexiga, rim, mama, cabeça e pescoço, próstata e pulmão (Salomon, Brandt, Ciardillo & Normanno, 1995; Yarden *et al.*, 2001). Nos TM, a sua sobreexpressão é mais frequente em TM triplo-negativos e TM inflamatórios (revisto por Masuda *et al.*, 2012). Os ligandos deste recetor são: EGF, TGF α , epiregulina, epigeno, HB-EGF, beta-celulano e anfiregulina (Olayioye *et al.*, 2000; Bazley & Gullick, 2005).
- HER-2, Erb-B2, c-erb-B2 ou *neu*: referido mais adiante;
- HER-3 ou Erb-B3: localizado no cromossoma 12 (Kraus *et al.*, 1989), apresenta 1342 aa e pesa 148 KDa, na espécie humana (Uniprot, 2013). Na espécie felina o gene localiza-se no cromossoma B4 e terá 4266 pares de base, dando origem a proteína de 1314 aa (GenBank, 2013). Mostra 81% e 83% de homologia com o HER-1 e o HER-2, respetivamente (Kraus *et al.*, 1989). O seu DIC tem uma zona de 29 aa perto sítio de ligação da ATP diferente dos outros membros e assim, não tem atividade de TQ (Carraway & Cantley, 1994), implicando sempre heterodimerização, geralmente com o HER-2 (Yarden, 2001; Atalay *et al.*, 2003).

Fisiologicamente, está envolvido na formação das válvulas átrio-ventriculares, nos precursores das células de Schwann, nos gânglios nervosos e no cerebelo, bem como nas vias celulares indicadas para o HER-1 (Riettmacher *et al.*, 1997; Wieduwilt & Moasser,

2008). Está sobreexpresso em tumores da mama, do estômago, do cólon e da próstata (Salomon *et al.*, 1995; Naidu, Yadev, Nair & Kutty, 1998; Yarden, 2001). Os ligandos que se ligam a este recetor são: NRG 1 e 2 e neuroglicano C (NRG 6) (Olayioye *et al.*, 2000; Kinugasa *et al.*, 2004; Bazley & Gullick, 2005).

- HER-4 ou Erb-B4: Localizado no cromossoma 2, tem 1308 aa e 147 KDa no Homem (Uniprot, 2013), apresentando 79% e 77% de homologia com o HER-1 e o HER-2 (Plowman *et al.*, 1993). Na espécie felina, o gene encontra-se no cromossoma C1, apresenta 4253 pares de bases e a sua proteína deverá ter 1308 aa (GenBank, 2013). Este recetor está implicado no desenvolvimento do miocárdio ventricular, do SNC, da glândula mamária, na transcrição de genes, na proliferação celular, na diferenciação, na migração e na apoptose (Garcia-Rivello *et al.*, 2005). Está sobreexpresso nos TM e nos tumores das células da granulosa do ovário (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Os ligandos deste recetor são: NRG 1,2,3 e 4 e a tomoregulina (NRG 5) (Olayioye *et al.*, 2000; Bazley & Gullick, 2005; Kinugasa *et al.*, 2005).

4.2. HER-2

O HER-2 foi deixado, propositadamente, para último lugar, pois é sobre ele que será dado um maior enfoque neste trabalho.

Foi o segundo membro da família EGFR a ser descoberto, em 1984 (Schechter *et al.*, 1984), e desde logo foi associado à formação de TM como resultado da amplificação génica (King, Kraus & Aaronson, 1985; Slamon *et al.*, 1987).

Também pode ser apelidado de *neu*, devido ao facto dos neuro/glioblastomas de ratos (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769), induzidos quimicamente pela etilnitrosureia, possuírem uma mutação no oncogene *neu*, que tinha bastante homologia com o HER-1 e com a mesma localização cromossómica que o HER-2, nos humanos: HER-2 e *neu* seriam, então, 2 genes idênticos e homólogos, um humano e outro murino (Schechter *et al.*, 1984; Coussens *et al.*, 1985; King *et al.*, 1985; Moasser, 2007). Também no rato, este gene foi associado a tumorigénese mamária, uma vez que todos os animais transgénicos desenvolviam TM, suportando o facto do gene *neu* poder promover e sustentar o TM neste modelo (Guy, Cardiff & Muller, 1996).

Na espécie humana, o gene HER-2 está localizado no braço longo do cromossoma 17, q21, codifica uma proteína com 1255 aa com peso de 185 KDa (Akiyama *et al.*, 1986; Ross *et al.*, 2004). O ortólogo felino do gene HER-2 mostra 92% de homologia com o HER-2 humano (de Maria *et al.*, 2005) e está localizado no cromossoma E1, com 3783 pares de bases. A proteína traduzida tem 1260 aa (GenBank, 2013).

A estrutura multidimensional do HER-2 é semelhante à estrutura dos restantes membros da família (ver figura 6), pelo menos na espécie humana (Uniprot, 2012):

- Péptido sinal: 1-22 aa
- Proteína propriamente dita:
 - DEC: 23 - 652 aa;
 - DTM: 653 - 675 aa;
 - DIC: 676 - 1255 aa (com a parte da atividade de TQ entre os resíduos 720 e 987).

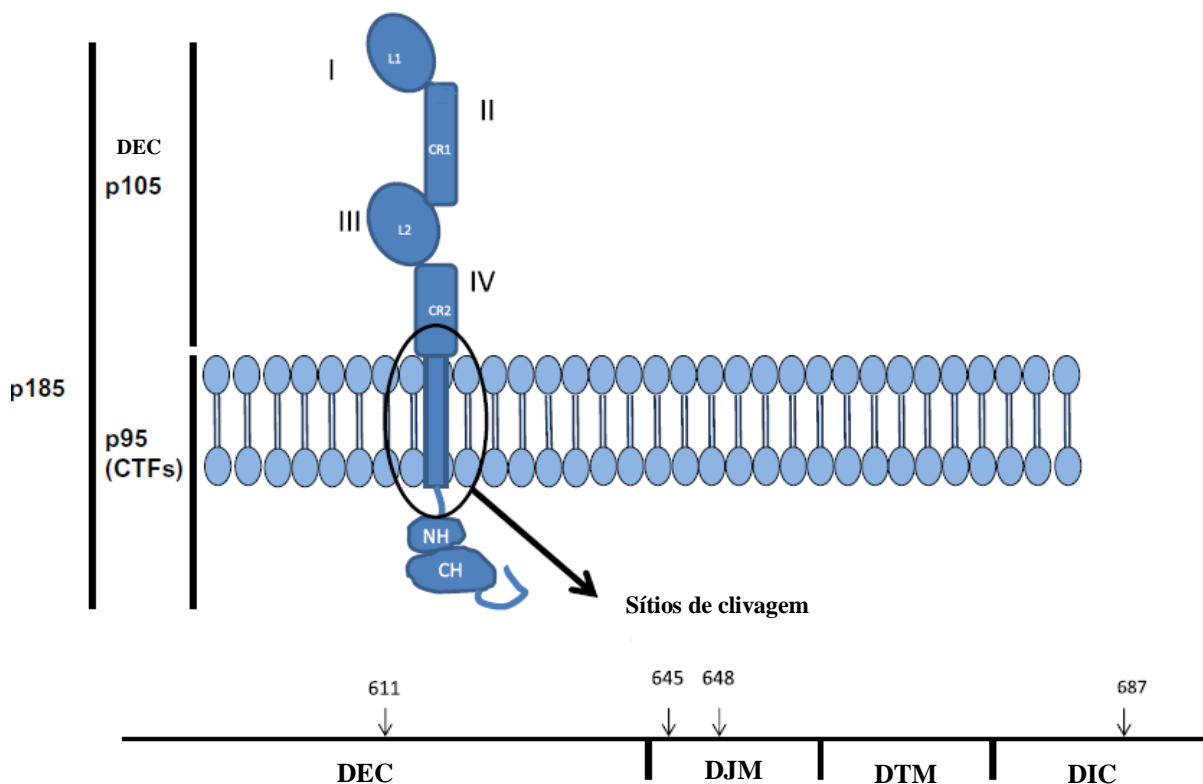


Figura 6 – Estrutura esquemática do recetor HER-2, com os vários domínios e subdomínios e com indicação do sítio onde se dá a clivagem (adaptado de Tsé *et al.*, 2012).

Em termos de polimorfismo, na espécie humana, existem 4 formas alélicas, devido a variações na posição 654 e 655 (Uniprot, 2013). Além disso, na espécie humana são consideradas 4 isoformas de HER-2, sendo que a primeira consiste na forma canónica e as restantes três resultam de iniciação alternativa e de *alternative splicing* (Uniprot, 2013).

➤ 4.2.1. Papel fisiológico

Em fetos humanos foi encontrado em 3 linhagens germinativas (epidermal, mesodermal e endodermal), estando associado ao desenvolvimento do sistema nervoso (Sistema Nervoso Periférico, células da glia, células precursoras das células de Schwann), do esqueleto, do

músculo, da pele, dos pulmões e do intestino (Quirke, Pickles, Tuzi, Mohamdee & Gullick, 1989; Peles & Yarden, 1993; Morris *et al.*, 1999; Jones & Stern, 1999; Yarden, 2011).

Atua ainda na formação e manutenção do miocárdio e na formação dos septos cardíacos, através da interação indireta da NRG-1 com o HER-2, por intermédio do HER-4 (Lee *et al.*, 1995; Meyer & Birchmeier, 1995).

Este recetor é tão importante no desenvolvimento embrionário que, na maioria dos estudos realizados em ratos (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769) transgênicos *knockout* para HER-2 estes morriam durante a fase de desenvolvimento no útero, geralmente por defeitos no sistema nervoso ou no coração (Olayioye *et al.*, 2000).

O HER-2 também é expresso nos cardiomiócitos adultos, o que tem implicações na fisiologia normal do coração, mormente aquando da utilização de anticorpos anti-HER-2 terapêuticos, uma vez que a perda da expressão do HER-2 no coração pode despoletar uma cardiomiopatia dilatada secundária (Garratt, Ozcelik & Birchmeier, 2003).

O HER-2 foi identificado, ainda, nas membranas celulares de células epiteliais do tubo digestivo, trato respiratório, trato génito-urinário, pele, mama e placenta (Press, Cordon-Cardo & Slamon, 1990). Em termos fisiológicos, regula a mitogénese epitelial, a mamogénese e a lactogénese. Estudos com ratos transgênicos *knockout* para HER-2 mostraram desenvolvimento mamário normal, mas falha no desenvolvimento dos lóbulos-alvéolos e menor secreção de leite (Jones & Stern, 1999). O HER-2 está ainda envolvido na transcrição de genes, favorecendo a síntese proteica e o crescimento celular (Olayioye *et al.*, 1999).

Na espécie felina, Winston, Craft, Scase e Bergman (2005) identificaram a expressão de HER-2 em vários tecidos normais: epitélio dos folículos pilosos, glândula mamária, estômago, intestino delgado, glândulas salivares, macrófagos esplénicos, córtex adrenal, epitélio tubular do rim e células de Leydig, o que demonstra a abrangência de locais onde o HER-2 deverá desempenhar funções fisiológicas.

➤ 4.2.2. Mecanismo de ativação

Ao contrário dos seus co-membros, este recetor não tem ligandos conhecidos. Assim, funciona mais como correcetor dos outros 3 membros da família, atuando em sinergia (Klapper *et al.*, 1999; Harari & Yarden, 2000; Rubin & Yarden, 2001).

Na verdade, o HER-2 é o membro dimerizante preferencial dos outros membros, uma vez que os heterodímeros de HER-2 geram sinais intracelulares mais potentes e mais duradouros (Tzahar *et al.*, 1996; Graus-Porta *et al.*, 1997) e têm um potencial mitogénico mais acentuado (Klapper *et al.*, 1999). Apesar de o HER-2 não ter ligandos que o reconheçam diretamente, a presença dos ligandos revela-se de extrema importância na sua ativação. É de salientar que,

no entanto, pode causar malignidade mesmo sem expressão de fatores de crescimento (ligandos), ou seja, tem um elevado nível de atividade constitutiva e níveis de expressão acima de um determinado limite levam ao desenvolvimento tumoral (Yarden & Sliwkowski, 2001).

Ao facto de não ter ligandos diretos não é alheio o pormenor da sua conformação. De facto, os sítios de ligação onde se ligam habitualmente, na família HER, os ligandos (subdomínios L1 e L2) estão obstruídos e unidos por uma interface (Burgess *et al.*, 2003). No entanto, apesar de não ter ligandos (ou por essa razão), o HER-2 assume sempre uma conformação fixa/aberta, semelhante à conformação dos outros recetores após a sua ativação (ver figura 7). De facto, o HER-2 tem uma forte interação entre L1 e L2, o que permite que o “braço de dimerização” esteja sempre exposto, possuindo este recetor uma conformação constitutivamente ativa (Citri *et al.*, 2003), ou seja, em estado permanente de capacidade dimerizante, podendo dimerizar com todos os membros da família, incluindo com ele próprio (Cho *et al.*, 2003). Esta característica outorga ao HER-2 a ausência de um estado anti-autoativação (Bazley & Gullick, 2005), contribuindo para o potencial maligno do HER-2 quando sobreexpresso, implicando aos homodímeros de HER-2 uma atividade de TQ constitutivamente ativa. Assim, a sobreexpressão do HER-2 e a sua consequente dimerização espontânea levam à sua maior fosforilação, com consequente ativação do recetor (Worthylake, Opresko & Wiley, 1999).

De notar que quando o DEC está truncado, ausente ou ligado, não inibe a atividade de TQ do HER-2 (Roskoski, 2004).

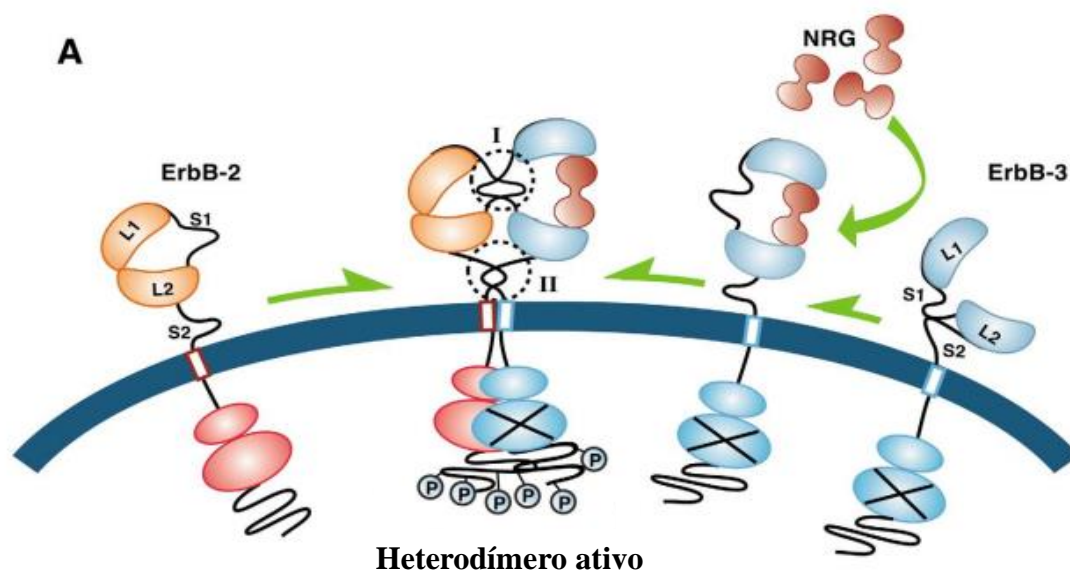


Figura 7 – Representação esquemática do recetor HER-2 em conformação sempre aberta, com braço de dimerização (S1) exposto, em comparação com HER-3, cujo braço de dimerização só fica exposto após ligando (NRG) se ligar (adaptado de Citri *et al.*, 2003).

➤ 4.2.3. Sobreexpressão e/ou amplificação

O HER-2 pode estar sobreexpresso nos cânceros da mama, cérvix, estômago, cólon, endométrio, esôfago, pulmões, pâncreas e em gliomas (Slamon *et al.*, 1989; Salomon, Brandt, Ciardiello & Normanno, 1995; Wieduwilt & Moasser, 2008).

Nos TM pode haver até 25 a 50 cópias do gene HER-2 (Kallioniemi *et al.*, 1992), na Mulher. Nesta espécie, vários estudos apontam para uma sobreexpressão do HER-2 em 15-30% do total dos TM (Slamon *et al.*, 1989; Owens, Horten & Silva, 2004), havendo uma forte correlação positiva entre a amplificação gênica (mais que as duas cópias normais do gene) e a sobreexpressão, com poucos casos descritos do contrário (sobreexpressão sem haver amplificação) (Slamon *et al.*, 1989; Kallioniemi *et al.*, 1992; Sauter, Lee, Bartlett, Slamon & Press, 2009). Segundo Jiménez *et al.* (2000), a sobreexpressão e a amplificação estão associadas, apesar de haver 3-10% de casos de sobreexpressão sem ocorrer amplificação o que pode ser explicado pela existência de falsos positivos atribuídos na IHQ (Tubbs, Pettay & Roche, 2001). Jiménez *et al.* (2000) referem ainda que os casos de carcinomas mamários com sobreexpressão sem amplificação são mais frequentes em carcinomas ductais *in situ*. Está, ainda, descrita uma mutação pontual, no resíduo 664, com a substituição da valina por um ácido glutâmico, tendo como consequência o aumento de atividade TQ, associada ao potencial de transformação maligna (Weiner, Liu, Cohen, Williams & Greene, 1989).

Fora esses aspetos, não estão, até à data, descritos outros mecanismos que expliquem a sobreexpressão de HER-2, além da amplificação (Sauter *et al.*, 2009).

Nesse sentido, numa grande revisão bibliográfica que abrangeu 107 estudos em 39730 pacientes humanos, Ross *et al.* (2009) constataram que a percentagem de TM com sobreexpressão de HER-2 foi de 22% (quando diagnosticados com IHQ) e de 24% (quando utilizado FISH).

Na espécie felina, os poucos estudos que existem revelam valores de sobreexpressão de HER-2 díspares. Enquanto Rasotto *et al.* (2011) identificaram 5,5% de carcinomas mamários HER-2+, Millanta *et al.* (2005) detetaram 56,9% de carcinomas HER-2+, de las Mulas *et al.* (2007) 40% e Soares *et al.* (2013) 33%. O grupo da FMV-UL que concluiu haver sobreexpressão de HER-2 num terço dos TMF, verificou que, ao contrário da Mulher, não existia nenhum caso de amplificação do gene HER-2 (Soares *et al.*, 2013), o que pode significar que existirá outro mecanismo que possa explicar a sobreexpressão da proteína HER-2, apesar de não se saber qual. Outro estudo demonstrou a existência de amplificação do gene HER-2 em apenas 16,6% dos TMF que apresentavam sobreexpressão da proteína HER-2 determinada por IHQ (Ordás *et al.*, 2007), o que deixa antever que, a existir a amplificação do oncogene, esta não será a

causa principal da sobreexpressão de HER-2 na Gata, apesar de serem necessários mais estudos.

Quando o HER-2 está expresso normalmente, formam-se poucos dímeros, que conduzem a respostas fracas e ao crescimento normal das células. Porém, nos casos de sobreexpressão do HER-2 ocorre um processo de tumorigênese mamária causada por vários mecanismos (estudos essencialmente na espécie humana), que, afim de uma melhor compreensão, vão ser, sumariamente, referidos:

- Elevada atividade basal de autofosforilação da TQ, de forma constitutiva (Conard *et al.*, 1990), com potencial transformante (Yarden & Sliwkowski, 2001);
- A sobreexpressão de HER-2 pode aumentar a disponibilidade para formação de heterodímeros (Harari & Yarden, 2000) e de homodímeros (Moasser, 2007);
- Capacidade de transformação de HER-2 aumenta quando co-expressa com HER-1 ou HER-3, com ação dos ligandos essenciais (Wallasch *et al.*, 1995; Harari e Yarden, 2000). De facto, os heterodímeros HER1/HER2 são os mais importantes na invasão através da membrana extracelular (Zhan, Xiang & Muthuswamy, 2006), enquanto os HER2/HER3 são os mais potentes
- A dependência de ligandos nos heterodímeros parece diminuir aquando da invasão metastática para os linfonodos regionais, uma vez que estes apresentam pouca disponibilidade em ligandos (Harari & Yarden, 2000), o que pode ser atribuído à ocorrência natural, mas rara de um *splice variant* de HER-2, com deleção de 16 aa no domínio extracelular. Esta isoforma é oncogénica e pode fazer a ativação do HER-2 independentemente de ligandos (Siegel, Ryan, Cardiff & Muller, 1999);
- Acerca das ciclinas (ciclinas D1, D2 e D3), já mencionadas, importa referir que são induzidas por estímulos mitogénicos (como as vias MAPK e PI3K), indo participar na regulação do ciclo celular. Em caso de sobreexpressão, vão fornecer ao TM um dos “hallmarks of cancer”, a autossuficiência em fatores de crescimento (estímulo mitogénico), desregulando um dos *checkpoints* celulares (entre a fase G1/S). Sabe-se que a sobreexpressão de HER-2 causa a sobre-regulação destas ciclinas (especialmente da ciclina D1) em carcinomas mamários (Bartkova *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000) e a diminuição de *p27*, um inibidor do ciclo celular, com ação e cinética inversa às ciclinas D1 (Zaczek, Brandt & Bielowski, 2005);
- A sobreexpressão de HER-2 está muito envolvida no processo de metastização, uma vez que em linhas celulares de carcinomas HER2+, as células com maiores níveis de expressão de HER-2 mostraram maior frequência de TIC (Magnifico, Abano & Campanero, 2009);

- Polimorfismos de HER-2 podem aumentar a autofosforilação do recetor, aumentando o risco de cancro por ativação das vias celulares (Kwong & Hung, 1998; Fleishman *et al.*, 2002; Baptista, 2011);
- A existência de formas truncadas e ativas de HER-2, como a ausência do DEC por *shedding*, também é responsável pelo aumento do potencial oncogénico;
- A sobreexpressão do recetor HER-2 retarda/diminui os vários processos de atenuação referidos anteriormente, causando, como consequência, sinalizações mais prolongadas (Harari & Yarden, 2000):
 - Desacelera a taxa de dissociação do ligando, pois há um incremento da afinidade de certos ligandos, como EGF e NRG (Harari & Yarden, 2000);
 - Favorece a taxa de reciclagem dos recetores (Yarden, 2001);
 - O HER-2 diminui a taxa de internalização do HER-1 (Sorkin, Fiore & Carpenter, 1993; Harari & Yarden, 2000);
 - Diminui a degradação lisossomal do HER-1 e provoca a recirculação do HER-1 à superfície celular (Worthylake *et al.*, 1999);
 - Diminui a sua própria *down-regulation* (Worthylake *et al.*, 1999).

➤ 4.2.4. Características clínicas dos tumores mamários HER-2 +

A sobreexpressão/amplificação do HER-2 está associada a tumores com elevada proliferação celular, crescimento rápido, motilidade, invasividade e angiogénese, bem como elevada capacidade de metastização e diminuição da apoptose (Moasser, 2007; Ross *et al.*, 2009). Em termos clínicos, caracterizam-se por ter graus histológicos moderados/elevados, com baixa expressão de RE e RP e metastização nos linfonodos regionais. Estão ainda associados a aneuploidia de ADN, mutações em *p53* e co-amplificação de *TOPIIa* (Colozza *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2009).

Em termos moleculares, como já foi referido, os TM definidos como luminal B e como HER2+ apresentam sobreexpressão de HER-2 (Perou *et al.*, 2000; Sørli *et al.*, 2001).

São conhecidos vários órgãos e tecidos onde a metastização é preferencial neste subtipo de TM, nomeadamente os linfonodos regionais (como os axilares), os pulmões, a medula óssea, o fígado, as adrenais e o ovário (Spigel & Burstein, 2002; Ross *et al.*, 2009). Ao contrário da espécie felina, onde ainda não existe tratamento específico para os TM HER-2+ (como o trastuzumab), na espécie humana, a imunoterapia anti-HER-2 tem vindo a mudar o padrão de metastização. Assim, hoje em dia, na Mulher, as metástases em órgãos viscerais têm vindo a diminuir, enquanto a frequência de metastização no SNC tem vindo a aumentar (a penetração

do trastuzumab no SNC pela barreira hemato-encefálica é diminuta) (Bendell *et al.*, 2003; Lin & Winer, 2007).

Um assunto implícito aquando do processo de metastização é a aferição de manutenção do *status* HER-2 no TM metastático, ou seja, saber se o *status* se mantém no decorrer da metastização. Vários estudos apontam valores de discordância entre os 10 e os 30% relativamente ao TM primário (TMP) (Simone *et al.*, 2001; Santinelli *et al.*, 2008; Lower, Glass, Blair & Hartman, 2009), havendo até no mesmo paciente discordância entre os vários locais de metástases (18% por IHQ e 19% por FISH, segundo Gancberg *et al.*, 2002) o que reforça a necessidade de determinação do *status* HER-2 não só no órgão primário (glândula mamária) como também nos sítios de metastização (Ross *et al.*, 2009).

Nos felinos, tal como na espécie humana, os TM HER-2+ têm mau prognóstico (Millanta *et al.*, 2005). Tendo em conta as várias características biológicas dos TMF, estes parecem ser um bom modelo para o estudo dos TM na mulher, especialmente hormono-independentes (Vail & MacEwen, 2000; de las Mulas *et al.*, 2005), uma vez que em termos de HP, de comportamento biológico (muito infiltrativo e com padrão de metastização semelhante ao humano: primeiro para linfonodos regionais, depois para órgãos como os pulmões) e de mecanismos moleculares, têm imensas semelhanças (MacEwen, 1990; de las Mulas *et al.*, 2000; Hansen & Khanna, 2004). Adicionalmente, a própria tumorigénese subjacente aos TMF apresenta características similares: elevadas expressões de ciclinas (D1 e A, por exemplo), baixa expressão de E-cadherina e mutações no *p53*, por exemplo (Murakami *et al.*, 2000; Dias-Pereira & Gärtner, 2003).

Uma nota que convém realçar, é que na espécie felina, aquando da apresentação em consulta, o TM já se encontra, geralmente, num estadio avançado, geralmente com metastização distante (Winston *et al.*, 2005), visto os animais virem tarde à consulta e estes tumores terem uma rápida progressão (Weijer & Hart, 1983).

4.3. Importância do diagnóstico de TM HER-2

Tendo em conta os vários pontos abordados anteriormente, compreende-se, facilmente, a importância dos métodos de diagnóstico de TM HER-2+. Além disso, a confirmação do *status* HER-2 do TM tem importância a nível de prognóstico e de valor preditivo a nível terapêutico e mesmo ao nível de tratamento.

➤ 4.3.1. Valor prognóstico

Assim que o oncogene HER-2 foi descoberto, o seu valor prognóstico começou a ser avaliado. Um dos primeiros estudos (Slamon *et al.*, 1987) constatou que a amplificação do

HER-2 tinha valor de prognóstico, e as mulheres com TM HER-2+ mostravam menores OS e DFS.

No seguimento deste primeiro estudo, a grande maioria dos estudos corroboraram este ponto. Numa grande revisão bibliográfica (Ross *et al.*, 2009), que contemplou 107 estudos e um total de 39730 mulheres, 88% dos estudos evidenciaram que a amplificação/sobreexpressão do HER-2 predizia um pior *outcome* clínico. Nessa mesma revisão, 73% dos estudos acrescentaram, ainda, que amplificação/sobreexpressão era um fator de prognóstico independente de outros fatores.

➤ 4.3.2. Valor preditivo da resposta à terapêutica

Esta característica tem menor impacto na espécie felina, devido à ainda rusticidade dos meios terapêuticos utilizados, quando comparados com o arsenal terapêutico em medicina humana. Não obstante, a utilização de biomarcadores, donde se destaca o HER-2, poderá permitir a utilização de terapêuticas mais dirigidas no futuro, com menores efeitos secundários (Piccart, Lohrisch, Leo & Larsimont, 2001).

Em boa verdade, em medicina Humana, o maior valor do HER-2 como marcador preditivo consiste na predição da resposta à terapêutica com trastuzumab, em que TM HER-2+ terão benefícios clínicos da sua utilização (Ross *et al.*, 2009).

Também está descrita a utilização do HER-2 na predição da resposta à terapêutica hormonal (como tamoxifen), onde TM com sobreexpressão de HER-2 não beneficiam desta terapêutica (Yamauchi *et al.*, 1997; Plácido *et al.*, 2003).

Ainda em termos do valor preditivo, falta realçar o papel da predição da resposta à quimioterapia. Parece haver alguma tendência que revela alguma sensibilidade dos TM HER-2+ à quimioterapia baseada em antraciclinas como a doxorubicina (Paik *et al.*, 1998; Rampaul, Pinder, Gullick, Robertson & Ellis, 2002). De facto, está descrita a co-amplificação conjunta do HER-2 e do gene da TOPII α , em até 40% dos TM HER-2+ (Colozza *et al.*, 2003), sendo que o mecanismo de ação subjacente à doxorubicina é a inibição desta TOPII α , em parte explicada pela justa-localização adjacente de ambos os genes no cromossoma 17 (Järvinen & Liu, 2003).

Há, contudo, estudos (Rozan *et al.*, 1998) que não atribuem um valor preditivo aos TM HER-2+ relativamente à quimioterapia por doxorubicina.

Na espécie felina (Soares *et al.*, 2013), um estudo recente contradiz esta relação, pondo em causa a utilização da doxorubicina como quimioterapia nos TM HER-2+ em gatos, uma vez que não foi verificada a amplificação do gene TOPII α .

Rampaul *et al.* (2002) afirmam ainda que o *status* HER-2 pode prever a resistência à quimioterapia com ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF), na espécie humana.

➤ 4.3.3. Terapêutica

Outra das vertentes onde este subtipo molecular de TM manifesta especificidade, ainda em fase de investigação na espécie felina, é no que toca à abordagem terapêutica. Conhecendo-se a sobreexpressão da glicoproteína na superfície celular, existem, actualmente, formas de tratamento dirigidas a esse recetor, com objetivo de o inibir.

Uma dessas possibilidades é através do trastuzumab (Goldenberg, 1999) ou Herceptin[®], um anticorpo monoclonal “highly purified recombinant DNA-derived humanized IgG₁”, que se liga ao DEC do recetor, inibindo-o. Mais recentemente, apareceu outro Ac-anti-HER2 (pertuzumab) que também se liga ao DEC, perto do local de dimerização, bloqueando a sua ativação (Franklin *et al.*, 2004).

Além destes anticorpos, investiga-se também: o desenvolvimento de vacinas dirigidas contra uma porção da proteína HER-2, que provoquem uma reação imunitária anti-DEC e uma ativação concomitante dos linfócitos T citotóxicos (Disis *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1997); imunotoxinas em que se acoplem anticorpos anti-HER2 a toxinas recombinantes de bactérias (exotoxinas de *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo) (Batra, Kasprzyk, Bird, Pastan & King, 1992); anticorpos ligados a fármacos dirigidos contra o lisossoma (Park *et al.*, 1995) e inibidores químicos da atividade TQ, como o lapatinib, para quebrar o ciclo de sinalização celular, inativando o efeito da sobreexpressão de HER-2 (Esteve *et al.*, 2009).

Na gata já foi estudado a utilidade do Interferão- ω recombinante felino e do Herceptin[®] em células cancerígenas, mostrando efeitos anti-proliferativos e sinérgicos com as antraciclina (Penzo, Ross, Muirhead, Else & Argyle, 2009; Soares, Comunicação Pessoal, 2012).

4.4. Diagnóstico dos TM HER-2+

A comprovar a magnitude da investigação realizada no campo dos TM HER-2+ temos a existência de inúmeros métodos de diagnóstico desenvolvidos afim de determinar o *status* HER-2. Esse diagnóstico pode fazer-se a vários níveis, tendo em conta o normal fluxo da informação genética (em que existe a informação genética codificada no ADN, que é depois transcrita em mARN, sendo depois essa informação traduzida em proteína).

Assim, é possível avaliar o *status* do HER-2 ao nível do ADN, do mARN e da proteína (Moelans, Weger, Wall & Diest, 2011). Seguindo esta cadeia e tendo em vista uma maior simplificação pedagógica dos conceitos, abordar-se-ão as várias metodologias de diagnóstico tendo em conta este fluxo.

Importa salientar que apesar de os últimos anos terem sido pródigos no aparecimento de metodologias de diagnóstico robustas e eficazes, continua a haver controvérsia sobre qual a melhor técnica. Atualmente, as duas técnicas “gold standard” são a IHQ e o FISH, apesar de todas, umas mais, outras menos, produzirem, naturalmente, resultados equívocos (Wolff *et al.*, 2007).

4.4.1. Diagnóstico ao nível do ADN

○ FISH (hibridização fluorescente *in situ*): através da utilização de sondas nucleotídicas fluorescentes, complementares ao gene HER-2, esta técnica é a segunda mais utilizada devido à sua elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico dos TM HER-2+ (Kallioniemi *et al.*, 1992; Rampaul *et al.*, 2002; Moelans *et al.*, 2011).

Depois da ligação das sondas ao ADN complementar (designada por hibridação), as lâminas podem ser visualizadas num microscópio de fluorescência (Moelans *et al.*, 2011). É ainda usada uma sonda centromérica específica para o cromossoma 17 (CEP17), que vai auxiliar na determinação do nível de amplificação, uma vez que o rácio de amplificação é determinado como o número de cópias do gene HER-2, relativamente ao número de centrómeros do cromossoma 17 (Kallioniemi *et al.*, 1992). Assim, a sonda centromérica é essencial para a determinação do rácio HER-2/CEP17 (Wolff *et al.*, 2007):

- Se o rácio for maior que 2,2 (ou mais de 6 cópias do gene HER-2 por núcleo, para sistemas sem sonda centromérica), o tumor é considerado HER-2 positivo, havendo amplificação do gene HER-2;
- Se o rácio for menor que 1,8 (ou menos de 4 cópias), não existe amplificação (teste negativo);
- Se o rácio se encontrar entre 1,8 e 2,2 (4 a 6 cópias do gene HER-2 por núcleo), então temos um resultado equívoco, que tem de ser esclarecido afim de se decidir a terapêutica.

As vantagens desta técnica são: a sua objetividade; a existência do controlo interno centromérico (permite diferenciar a amplificação da aneuploidia); a sua elevada especificidade e sensibilidade; a sua reprodutibilidade e o facto de ser uma técnica que avalia o ADN, que é menos afetado por artefactos de processamento do tecido (Jiménez *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2009; Sauter *et al.*, 2009; Moelans *et al.*, 2011).

No entanto, a técnica de FISH necessita de equipamento especializado (microscópio de fluorescência), é uma técnica cara, requer um técnico especializado e consome muito tempo. Além disso, a execução da técnica é prejudicada pela presença de autofluorescência e sobreposição nuclear, enquanto a fluorescência se desvanece com o tempo e, por isso, as lâminas devem ser armazenadas a -20°C. Acresce ainda o facto da morfologia tumoral poder

ser modificada, uma vez que esta técnica exige uma digestão proteica prévia e a heterogeneidade tumoral pode, assim, passar despercebida (Jacobs *et al.*, 1999; Moelans *et al.*, 2011). À semelhança da IHQ, existem testes comerciais aprovados: PathVysion[®] (Vysis) e INFORM[®] (Ventana).

- CISH (Hibridação cromogénica *in situ*): serve de alternativa ao FISH, tendo por base uma reação de imunoperoxidase que permite visualizar as sondas HER-2 num microscópio de luz convencional. Assim, consegue conjugar algumas vantagens da IHQ (baixo custo e utilização de um microscópio ótico) com as vantagens da FISH (controlo interno e técnica objetiva) (Moelans *et al.*, 2011).

Pode ser unicolor (monosonda, que só determina o número de cópias do gene HER-2) ou bicolor (simultaneamente com sondas HER-2 e sondas CEP17). Quando é unicolor, é uma técnica mais limitada, não havendo correção com a sonda centromérica.

A concordância desta técnica com a FISH é de 98% (Hanne & Kwok, 2006).

É uma técnica mais rápida e menos cara que a de FISH, mais simples e reprodutível, permitindo a observação simultânea do tecido corado com hematoxilina, uma vez que é feita num corte de tecido parafinado (Tanner *et al.*, 2000; James *et al.*, 2008), não sendo tão efémera quanto a técnica de FISH (Hanna & Kwok, 2006).

- SISH (hibridação com prata *in situ*): esta variação às duas técnicas referidas anteriormente usa a HRP que catalisa a redução do acetato de prata, produzindo um sinal preto. Possibilita a utilização de uma sonda anti-CEP17, que pode ser detetada numa lâmina sequencial. Tem um sistema de *scoring* semelhante a FISH e CISH (Moelans *et al.*, 2011).

Em termos de vantagens e desvantagens, é muito semelhante a CISH, sendo uma técnica rápida, objetiva e usa um microscópio de luz tradicional (Dietel *et al.*, 2007; Papouchado *et al.*, 2010). Tem uma concordância com a FISH de 97% (Papouchado *et al.*, 2010).

- MPLA (multiplex ligation-dependent probe amplification): esta técnica quantifica sequências de ADN, requerendo apenas pequenas quantidades de amostra, que pode ser material parafinado. Baseia-se na hibridação de pares de sondas com sequências-alvo específicas de genes a avaliar (neste caso o HER-2) e posterior amplificação. Todas as sondas ligadas têm uma sequência terminal idêntica, permitindo amplificação simultânea pela PCR, usando apenas um par único de primers. Cada sonda dá origem a produtos de amplificação com tamanho único que são posteriormente separados por electroforese (Schouten *et al.*, 2002). A altura relativa do pico de cada sonda (rácio comparado com o das sondas de

referência em áreas estáveis do genoma) correlaciona-se com a quantidade de ADN alvo presente, calculada com *software* específico (Moelans *et al.*, 2011).

É uma técnica fácil de executar e facilmente interpretável, barata e pode analisar até 45 genes num só ensaio, como por exemplo genes com implicações na terapêutica e no prognóstico dos TM (Moelans *et al.*, 2011). Mostra, ainda, uma boa concordância com FISH e CISH. Porém, nesta técnica perde-se a morfologia dos tecidos, podendo falsear os resultados em zonas muito heterogéneas (Moelans *et al.*, 2011).

- *Southern Blot*: avalia a quantidade relativa de ADN de HER-2 em amostras frescas de TM. Não é um método rotineiramente utilizado, sendo antigo, e foi dos primeiros que permitiu verificar a amplificação do gene HER-2 (Slamon *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 2009). A sua sensibilidade é boa e a especificidade é elevada e não é afetada por condições pré-analíticas e analíticas como no caso da IHQ.

Apesar disso, é uma técnica que não se encontra padronizada e não é realizada no suporte da lâmina de vidro (Rampaul *et al.*, 2002).

4.4.2. Diagnóstico ao nível do ARN (mARN)

- qRT-PCR (Real-time polymerase chain reaction - reação de polimerase em cadeia em tempo real, quantitativa), é utilizado em estudos não-clínicos devido às dificuldades de isolamento de ARN a partir de material parafinado e à grande instabilidade do ARN (Moelans *et al.*, 2011).

A técnica de qRT-PCR para além de detetar os transcriptos específicos, também os quantifica (Nelson & Cox, 2005).

A qRT-PCR tem como vantagens um menor custo, a rapidez de execução, o facto de estar automatizada, ser reprodutível e facilmente interpretável, podendo ser usada com outros marcadores de interesse nos TM (como os RE, RP, Ki67, etc.) e não precisa de muito material para se realizar. Acresce ainda a vantagem de não ter variabilidade inter-observador e de ser exequível em laboratórios de pequena dimensão. Por fim, apresenta uma elevada especificidade e os resultados mostram uma boa correlação com o prognóstico (Vinatzer, Dompier & Streubel, 2005; Capizzi *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2009).

Como desvantagens, além das dificuldades de isolamento e de armazenamento dos tumores até à extração do ARN, é uma técnica sem uma base morfológica, sendo preciso escolher bem a área a avaliar (Vinatzer *et al.*, 2005).

- *Microarray* (avalia ARN e ADN): este teste analisa a expressão de vários genes, como o HER-2, mas também de RE e RP, permitindo a aferição simultânea da expressão de ARN nos tecidos (Khanna & Paoloni, 2007; Moelans *et al.*, 2011). Falámos já desta técnica, brevemente, aquando dos *microarrays* de ADN, no retrato molecular dos TM.

Tem como aspetos positivos uma elevada reprodutibilidade e robustez, além de permitir obter resultados quantitativos. Permite, ainda, analisar muitas amostras de TM em simultâneo.

Os principais aspetos negativos são a necessidade de infra-estruturas e a compra de equipamentos específicos, e o facto das amostras do tecido serem muito pequenas e poderem não ser representativas do tumor (Glas *et al.*, 2006; James *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2009; Moelans *et al.*, 2011).

4.4.3. Diagnóstico ao nível da proteína

- *Imunohistoquímica*: É atualmente a técnica, senão a mais importante, pelo menos a que é usada há mais tempo para avaliar a sobreexpressão do recetor (Gusterson *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 2009)

As lâminas de tecido histológico são desparafinadas e re-hidratadas e procede-se à recuperação do antigénio. Depois, são incubadas com um anticorpo primário, específico da proteína HER-2 (quer do DIC, como o A0485 da DAKO® e o CB11 da Novocastra®; quer do DEC, como o SP3 da Neomarkers®, o 4D5 da Ventana® e o TAB250 da Invitrogen®) e depois com um anticorpo secundário, dirigido contra o anticorpo primário. Este anticorpo secundário está acoplado a uma peroxidase (HRP), que vai catalisar a reação, quando se adiciona um cromogénio (DAB - diaminobenzidina), produzindo um precipitado castanho, visível com microscópio de luz convencional (Erhart & Power, 2007).

A coloração da membrana é feita de uma forma estequiométrica: quanto maior a quantidade de HER-2 no tecido, maior a marcação membranar (Moelans *et al.*, 2011).

Ao contrário doutros casos de IHQ, esta técnica é semi-quantitativa (Ross *et al.*, 2009). A avaliação da expressão (ver figura 8) faz-se de acordo com as *guidelines* da ASCO (American Society of Clinical Oncology - Sociedade Americana de Oncologia Clínica) (Wolff *et al.*, 2007; Dastana, Alsabeh & Rose, 2008; Ross *et al.*, 2009):

- 0: sem marcação (considerado negativo). Tem menos de 20.000 recetores por célula;
- 1+: marcação fraca e incompleta, com menos de 10% de células a exibir marcação da membrana completa (considerado negativo para HER-2). Apresenta cerca de 100.000 recetores por célula;
- 2+: Marcação fraca/moderada da membrana, completa mas não uniforme, em mais de 10% das células. Este resultado é considerado equívoco, sendo necessário ser validado

através da técnica de FISH. Na verdade, na Mulher, apenas 15-48% dos TM HER-2+ mostram a amplificação génica detetável por FISH. A intensidade de marcação equivale a cerca de 500.000 recetores por células;

- 3+: Marcação uniforme e intensa em mais de 30% das células tumorais. As regras de classificação anteriores permitiam a classificação máxima com apenas 10% das células positivas. A nova classificação permite uma maior concordância com os resultados de FISH. Cada célula tumoral apresenta 1.000.000 a 2.000.000 recetores.

Em termos de vantagens da técnica pode-se referir: a sua extensa utilização; permite a avaliação simultânea da morfologia tumoral (importante em tumores heterogêneos); possibilidade de fácil e durável preservação da lâmina e a avaliação através de um microscópio de luz convencional.

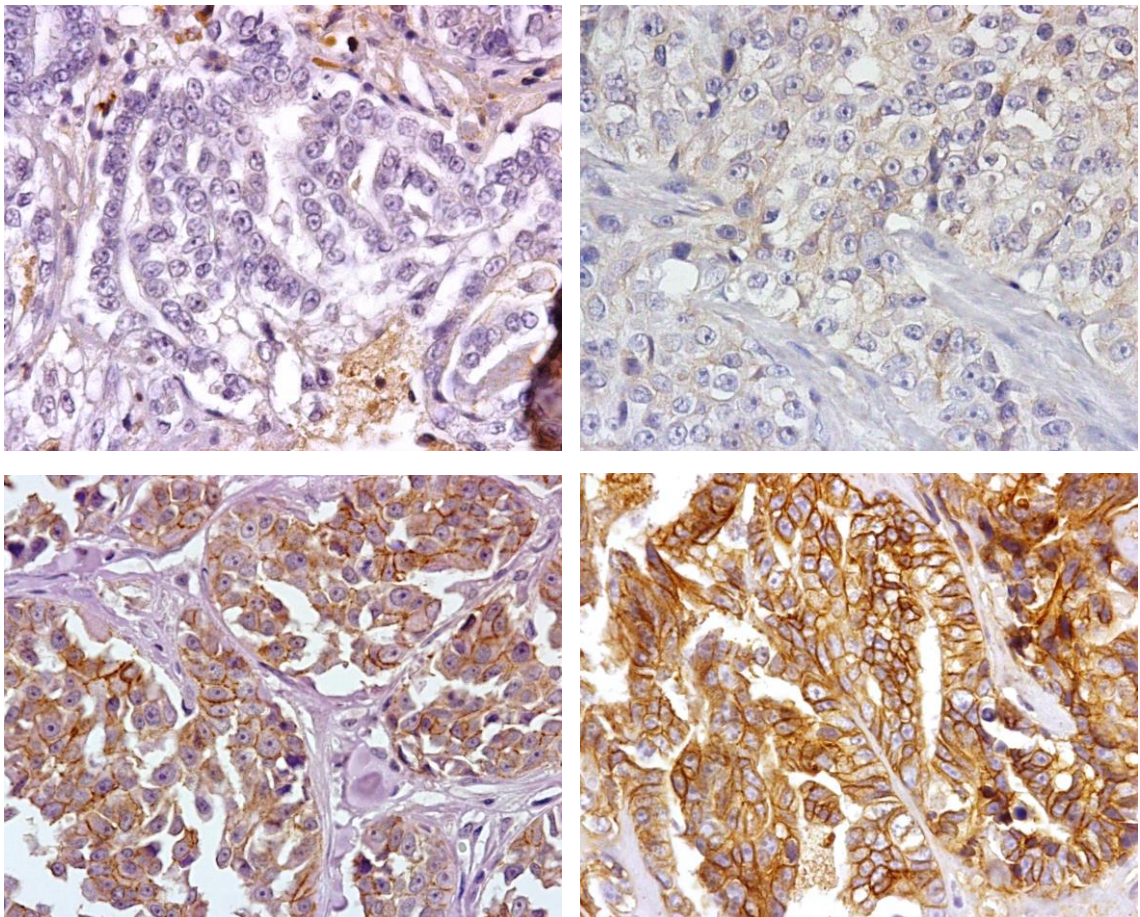


Figura 8 – Conjunto de 4 imagens referentes a adenocarcinomas mamários felinos, após IHQ para HER-2. Na posição superior a imagem do lado esquerdo refere-se a um TMF classificado como 0 e a do lado direito a um TMF 1+. Na posição inferior, a imagem esquerda foi classificada como 2+ e a direita como 3+. Imagens gentilmente cedidas por Dra. Maria João Soares, FMV-UL.

Como desvantagens, a fiabilidade desta técnica varia consoante as condições pré-analíticas (armazenamento, duração e tipo de fixação da massa neoplásica) e as condições analíticas (tipo de recuperação antigénica, anticorpo - monoclonal ou policlonal, anti-DEC ou anti-DIC), carece de standardização da técnica, requer um controlo interno e necessita de patologistas experientes para avaliação das lâminas, uma vez que o sistema de avaliação é subjetivo (Rampaul *et al.*, 2002 ; Vinatzer *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2009).

A técnica de IHQ tem maior probabilidade de originar falsos positivos e falsos negativos comparativamente à técnica de FISH (Harris *et al.*, 2001), especialmente em laboratórios com pouco volume de amostras. De facto, laboratórios centrais com grande volume de testagens têm maior concordância entre IHQ e FISH do que laboratórios mais pequenos (pode haver uma discordância máxima de 20%, segundo Wolff e colegas, 2007) uma vez que nestes últimos pode haver falta de standardização da técnica e uma sobre-avaliação de TM 3+, devido a *interpretation bias*, por haver menos casos (Paik *et al.*, 2002).

No entanto, pode afirmar-se que existe uma excelente correlação entre IHQ e FISH (91-97%, Jacobs *et al.*, 1999; Bánkfalvi *et al.*, 2000), havendo as maiores discrepâncias nos TM HER-2 2+, como seria de prever. Estas incongruências podem estar relacionadas com alguma variabilidade na fixação e no processamento de tecidos, com o tipo de anticorpo ou modo de recuperação antigénica utilizada (o que alerta para a necessidade de standardizar a técnica ao máximo), com a heterogeneidade intratumoral e com a polissomia no cromossoma 17 (Shah *et al.*, 2010).

Há testes comerciais aprovados para IHQ, como o HercepTest® (DAKO) e Pathway® (Ventana).

- ELISA e *Dot Blot*: estas técnicas também determinam o nível proteico de HER-2 e serão abordadas em maior detalhe aquando da determinação sérica de TM HER2+.

- Ensaio de dimerização e proteicos: esta é uma técnica muito recente, desenvolvida pela Monogram®, através de tecnologia VeraTag®, que permite a medição dos níveis de proteína total e dos níveis de dímeros de HER-2 em tecidos parafinados.

Este teste usa dois anticorpos monoclonais específicos para epítomos específicos e próximos no HER-2, o que vai fazer com que os dois anticorpos se liguem em estreita proximidade ao mesmo recetor. A um desses anticorpos liga-se o “VeraTag reporter” fluorescente enquanto o outro está conjugado com biotina e ligado a uma molécula fotossensibilizadora.

Esta molécula fotossensibilizadora é ativada por fotoativação da amostra com um certo comprimento de onda, gerando-se radicais livres de oxigénio. Esses radicais livres de

oxigénio vão clivar o “VeraTag reporter” do outro anticorpo, que está muito perto. Esse “VeraTag” clivado vai ser libertado e recolhido, sendo quantificado por electroforese capilar, permitindo determinar a quantidade de HER-2 dimerizado (Shi *et al.*, 2009).

Parece ser 7-10 vezes mais sensível que a IHQ (Moelans *et al.*, 2011), podendo ser útil na re-classificação dos TM que tinham sido préseleccionados para tratamento com trastuzumab através de IHQ e FISH, segundo um estudo recente (Desmedt *et al.*, 2009).

Estas técnicas diagnósticas supra-citadas referem-se, exclusivamente, a um conjunto de metodologias que determinam o *status* HER-2 no tecido. Porém, este conjunto de técnicas padece, como será de se esperar, de limitações (Carney *et al.*, 2003):

- São um “one time test”, em que após a remoção da massa ou do TM é difícil fazer a monitorização em tempo real da evolução clínica do paciente;
- Qualquer das técnicas, mesmo as mais sensíveis e específicas, mostram limitações técnicas e ainda há falta de standardização em várias delas;
- São metodologias invasivas (Lam *et al.*, 2012);
- Existe perda de antigénio nos tecidos arquivados (Fergenbaum *et al.*, 2004);
- O *status* HER-2 no tecido pode não ser congruente com o *status* HER-2 sérico, podendo um TM HER2 negativo mostrar níveis aumentados do HER-2 sérico e vice-versa (Krainer *et al.*, 1997).

4.6. Fator sérico de HER-2

De forma a ultrapassar as limitações descritas acima, começou a averiguar-se utilidade em determinar o *status* do HER-2 no sangue periférico. Assim, no princípio da década de 90 do século passado, alguns estudos provaram, através da utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra o DEC, que este domínio do HER-2 aparecia no sobrenadante de culturas de células tumorais mamárias (SKBR3) e que tinha massa molecular estimada de 105-110 KDa (Mori *et al.*, 1990; Zabrecky, Lan, Mackenzie & Carney, 1991). Desta forma, postulou-se que deveria haver algum processo enzimático que induziria à clivagem proteolítica (Lin & Clinton, 1991; Pupa *et al.*, 1993), libertando o DEC do recetor. Além do mais, esta clivagem poderia ainda participar no mecanismo de ativação da atividade de TQ, segundo suposições dos autores. Desde logo ficou patente a possibilidade do DEC do HER-2⁷ ser um biomarcador

⁷ Doravante, tendo em conta a quantidade de vezes que será utilizado o termo “DEC sérico do HER-2” será abreviado para sHER-2.

que pudesse correlacionar-se com o *status* do HER-2 no TM (Lin & Clinton, 1991; Zabrecky *et al.*, 1991; Pupa *et al.*, 1993).

Simultaneamente, o sHER-2 foi detetado no sangue periférico de pacientes com TM. A sua concentração estava significativamente aumentada em doentes com doença avançada ou metástases distantes (Mori *et al.*, 1990; Leitzel *et al.*, 1992). Posteriormente, foi estabelecida uma associação estatística positiva entre a sobreexpressão e/ou amplificação do HER-2 no tumor e os níveis elevados do sHER-2 (Narita, Funahashi, Satoh & Takagi, 1992; Andersen, Paus, Nesland, Mackenzie & Børresen, 1995).

Desde logo ficou, também, evidente que os soros controlos de pessoas sem TM (saudáveis) não tinham os níveis do sHER-2 elevados (Leitzel *et al.*, 1992; Pupa *et al.*, 1993).

Como adenda, o aumento do sHER-2 também foi demonstrada em tumores ováricos, colorectais, pancreáticos, prostáticos e em hepatomas (Wu, Astill & Zhang, 1993).

Numa grande revisão bibliográfica, englobando 55 estudos, aponta-se que, em média, ocorre um aumento de 18,5% no nível de sHER-2⁸ em TM primários e de 43% em TM metastáticos (Carney *et al.*, 2003).

Adicionalmente, os níveis do sHER-2 estão mais aumentados quando há metastização distante (68%) comparativamente a metastização em áreas locorregionais (19%) (Andersen *et al.*, 1995), indicando que os valores do sHER-2 podem indicar recidiva/metastização do TM antes do diagnóstico clínico (Carney *et al.*, 2004).

Apesar destas evidências, não há, até ao momento, uma grande abundância de estudos que mostrem claramente uma concordância entre os valores de HER-2 no tecido e no sangue (Tsé *et al.*, 2012). Kath *et al.* (1993) falam numa concordância entre a IHQ e o sHER-2 de 73%. Posteriormente, Ludovini *et al.* (2008) determinam 87% de concordância entre o *status* do HER-2 no TMP e o nível do sHER-2. Em termos de robustez, a quantificação do sHER-2 apresenta uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 83% em relação à IHQ e uma sensibilidade de 90% e especificidade de 77% em relação à técnica de FISH (Tsé *et al.*, 2005). Em certos estudos, só é observada concordância em TM com metástases (Garoufali *et al.*, 2008), enquanto outros estudos denotam algumas discordâncias de *status*, especialmente em TMP sem metástases (Fontana *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2009).

Aliás, um ponto particularmente interessante, refere-se ao facto de alguns estudos referirem que alguns casos onde o *status* do HER-2 determinado por IHQ era negativo, mostraram aumentos do sHER-2 durante o desenvolvimento de metástases. Ou seja, há uma subpopulação de pacientes, cujo TMP é negativo para HER-2, por IHQ e FISH, mas positivo

⁸ Por aumento, quer-se dizer que o valor está acima de um *cutoff* definido.

por testagem sérica, ou vice-versa (menos comum) (Carney *et al.*, 2003). Algumas das causas que, possivelmente, poderão explicar este fenómeno são:

- As técnicas usadas para a avaliação do *status* de HER-2 no tecido (IHQ ou FSH) e no sangue (ELISA) são diferentes (Carney *et al.*, 2003);
- O próprio sistema de classificação para a positividade; os TM positivos para HER-2 têm mais de 30% de células tumorais com marcação (3+) na IHQ ou mais de 2,2 no rácio HER2/CEP17. Abaixo desses valores, inscrevem-se os TM negativos. Porém, apesar de negativos, podem possuir células positivas para o HER-2 no TMP, células essas que estão imbuídas de uma “vantagem de crescimento”, devido às vias celulares que ativam e que podem ser suficientes para produzirem metástases HER2+ e fazerem aumentar o sHER-2 (Carney *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2011);
- A heterogeneidade tumoral (Pallud *et al.*, 2005); o aumento do sHER-2 é mais expressivo em tumores mistos (invasivos e intraductais) que em invasivos ou intraductais puros. Também relacionado com a heterogeneidade (heterogeneidade intra-tumoral, neste caso), existem problemas de amostragem, especialmente quando se analisam biópsias de pequena dimensão (Pallud *et al.*, 2005);
- Mudanças no *status* e na natureza cinética do sHER-2. Os meios convencionais para diagnosticar o *status* do HER-2 no tecido realizam-se a uma determinada altura. Porém, uma das características gerais dos tumores, e dos tumores mamários HER-2+, é a sua natureza progressiva, podendo assistir-se a uma alteração no *status* na passagem do TMP para TMM. No decurso da progressão, a percentagem de células HER-2 pode aumentar, alterando o *status* do TM (Fehm *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2012). Assim, os níveis de sHER-2 mudam de normal nos TMP para aumentados nos TMM, em 32% dos pacientes (Asgeirson *et al.*, 2007);
- Interferência sérica, com a existência de *background noise* ou falsos positivos. Na verdade, há uma percentagem de pacientes controlo (saudáveis), com valores de sHER-2 aumentados (4 a 22,2%, segundo revisão de Lam *et al.*, 2002). Estas percentagens de saudáveis com valores anormais de sHER-2 podem incluir alguns falsos positivos, o que pode ser contornado, aumentando os níveis de *cutoff* (que aumentam a especificidade) de forma a ter resultados mais fidedignos;
- Falta de standardização da técnica:
 - Amostras pequenas podem ser causa de discordância (Kandl *et al.*, 1994);
 - Há muita variação interestudos, nomeadamente devido à utilização de: diferentes populações (TMM, TMP, etc.); número de amostras diferentes; tipo de ensaio utilizado; momento da recolha da amostra (antes e/ou após cirurgia/tratamento);

unidades de quantificação (ng/ml, fmol/l, U/ml); diferentes *cutoffs* adotados (Leyland-Jones & Smith, 2011; Lam *et al.*, 2012)

- A natureza do anticorpo: a utilização de anticorpos anti-DEC pode falsear os resultados na IHQ, uma vez que tendo-se dado a clivagem deste domínio do receptor, deixa de haver local para ligação do anticorpo no tecido (Kandl *et al.*, 1994). Num estudo, Pallud *et al.* (2005) determinaram que com o anticorpo A0485 (policlonal) havia níveis elevados do sHER-2 em 48% dos TMP positivos para HER-2 e com o anticorpo CB11 (monoclonal) havia 60%, o que denota a relevância que a natureza do anticorpo pode ter.
- O tamanho do tumor; só havendo aumento dos níveis de sHER-2 a partir de um limiar mínimo de tamanho (28-30 mm), segundo Pallud *et al.* (2005), na Mulher;
- Disfunção hepática (Tsé *et al.*, 2012);
- Pode refletir a existência de micrometástases HER-2+ (Ludovini *et al.*, 2008);
- Pode representar um subgrupo dos TM HER2+ com elevado *shedding* (Ludovini *et al.*, 2008);
- Variações inter-individuais de expressão das proteases MMP e ADAM, que resultam em diferentes níveis destes ativadores nos TM (Yang *et al.*, 2012).

Contudo, as *guidelines* da ASCO acerca da utilização de marcadores tumorais nos TM não recomendam a medição de sHER-2 (Harris *et al.*, 2007), sendo importante ressaltar que apesar das evidências acerca da utilidade deste biomarcador tumoral (sHER-2) e da tendência ser, claramente, de ir no sentido da sua aceitação, esse facto ainda não é unânime, sendo necessárias mais investigações. Para esse facto, contribui, sem sombra de dúvida, a falta de standardização dos vários estudos (Kong *et al.*, 2011).

No entanto, apesar da quantificação do sHER-2 não substituir os testes tradicionais (IHQ/FISH), poderá complementá-los, aumentando a sua acurácia, apesar dos dados disponíveis não serem totalmente concordantes e, de alguma forma, até divergentes (Tsé *et al.*, 2012).

Apesar deste trabalho se inserir no âmbito dos TM na espécie felina, não há quaisquer estudos, até à data, no que concerne à existência ou avaliação do sHER-2 nesta espécie, o que implica que se utilizem estudos realizados na espécie humana para ilustrar a determinação, a formação e a utilidade deste marcador.

4.5.1. Formação do sHER-2

Nos TM com sobreexpressão de HER-2, conforme já referido anteriormente, a ativação destes recetores pode dar-se de duas formas: por dimerização ou pela iniciação da transdução do sinal realizada nas formas truncadas ativas (Tsé *et al.*, 2012).

A primeira, já abordada, pode ser homo ou heterodimerização (Yarden, 2001); A segunda via é induzida por fragmentos carboxilo-terminais (carboxil-terminal fragments, CTF) que retêm atividade de TQ (Lin & Clinton, 1991). Estas formas são, coletivamente, designadas por p95, por terem um peso molecular de, aproximadamente, 95 KDa (Arribas, Baselga, Pedersen & Parra-Palau, 2011).

Estes CTF são originados por:

- Iniciação alternativa da tradução a partir da metionina 611 ou da metionina 687 do transcrito do HER-2 (Anido *et al.*, 2006). Essa iniciação alternativa gera dois fragmentos (p95): um com 100-115 KDa, a montante do domínio transmembranário, apelidado de 611-CTF; outro com 90-95 kDa, a jusante do domínio TM, apelidado de 687-CTF (Pedersen *et al.*, 2009). No entanto, o 611-CTF homodimeriza constitutivamente, promovendo a formação de TM e de metástases (Pedersen *et al.*, 2009). De facto, a atividade deste 611-CTF deve-se, em parte, a um pequeníssimo domínio extracelular, constituído por 5 cisteínas, que são capazes de formar pontes de dissulfureto, gerando homodímeros constitutivamente. O fragmento 687-CTF não é capaz de se ativar desta forma, uma vez que só tem quatro aa no DEC e nenhuma cisteína, não sendo capaz de promover dimerização (Pedersen *et al.*, 2009; Arribas *et al.*, 2011). Adicionalmente, os níveis de ativação da transdução do sinal pelo HER-2 e pelos CTFs são cinética e quantitativamente diferentes; o 611-CTF regula a expressão de um grupo de genes diferentes, que estão implicados na progressão de metástases (como MET, MMP1, EPHA2, IL11 e ANGPTL4), levando ao desenvolvimento de TM agressivos e com pior prognóstico que os TM com proteína inteira (Molina *et al.*, 2002; Sáez *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2009).

Como será de esperar, os TM que expressam p95HER-2 são resistentes a Ac anti-DEC (porque carecem do sítio de ligação deste anticorpo), apesar de serem sensíveis aos inibidores de TQ, como o lapatinib (Anido *et al.*, 2006).

- Clivagem/*shedding* do DEC, que leva à formação quer de *CTFs intracelular membrane-bound* e de DEC solúveis (sHER-2), possível de ser detetado no soro (Pupa *et al.*, 1993). Por *shedding* entende-se a libertação do ectodomínio por clivagem proteolítica (Tsé *et al.*, 2012).

Como já foi referido, o conceito “sHER-2” remonta aos anos 90, quando foi descoberta a existência de um fragmento solúvel de HER-2, com cerca de 105-110 KDa, no sobrenadante dos meios de cultura de células tumorais mamárias e no soro de doentes com TMM (Zabrecky *et al.*, 1990; Lin & Clinton, 1991; Pupa *et al.*, 1993).

A clivagem proteolítica dá-se na área justamembranar, na alanina 648 (Yuan *et al.*, 2003). Este processo é, então, responsável pela criação de um fragmento truncado ancorado à membrana (p95) com atividade de TQ, após remoção do DEC (Christianson, Joni, Doherty, Yuzhang & Lin, 1998).

Na verdade, a clivagem do DEC amplia a atividade de quinase e estimula o potencial transformador do fragmento N-terminal truncado, sendo, inclusive, mais oncogénico que o HER-2 inteiro (Segatto *et al.*, 1988; Tsé *et al.*, 2012), uma vez que a clivagem cria uma proteína com intervenção em várias vias de sinalização celular (Tsé *et al.*, 2012).

Já foi referido que há um conjunto de enzimas com um papel primário na clivagem, globalmente apelidadas de proteases (Tsé *et al.*, 2012). Nesse conjunto de proteases englobam-se vários membros das famílias ADAM (A Disintegrin And Metalloproteases - Metalloproteases e disintegrinas) e MMP (Matrix Metalloproteases - metaloproteases da matriz) (Sanderson, Dempsey & Dunbar, 2006):

- ADAM (Reiss & Saftig, 2009): são uma família de glicoproteínas membranárias responsáveis por vários processos na neurogénese, angiogénese, adesão celular, migração, sinalização, fertilização e proteólise (Edwards, Handsley & Pennington, 2008; Duffy, McKiernan, O'Donovan & McGowan, 2009; Reiss & Saftig, 2009). Importante para o contexto da temática desta dissertação, é a sua implicação na proteólise dos DEC de várias proteínas, como os ligandos da família HER e os seus recetores; Elas geralmente ativam o primeiro passo da proteólise, levando à ativação de vias de sinalização celular e à libertação do DEC solúvel (Reiss & Saftig, 2009).

Nos TM já foi demonstrada a sobreexpressão das ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15 e ADAM-17 (Duffy *et al.*, 2009; Tsé *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2006) e Tsé *et al.* (2012) referem que destes membros, o de maior importância como “shedase” do HER-2 nos TM é a ADAM-10;

- MMP: representam uma família de proteases com elevada capacidade para degradar proteínas estruturais da matriz extracelular, com importância nos fenómenos de invasão e extravasão tumoral, progressão e alteração do micro-ambiente estromal (Sternlicht, Bissel & Werb, 2000; Sternlicht & Werb, 2001).

Todavia, estas proteases não se furtam, também, a terem um papel fulcral na clivagem de moléculas localizadas na superfície celular (por exemplo do HER-2) ou outras proteínas pericelulares não-matriciais, regulando assim o ciclo celular (Sternlicht & Werb, 2001).

Dos vários tipos de MMPs conhecidos, os com maior importância no desenvolvimento tumoral são os MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 (Sternlicht & Werb, 2001).

Existe uma família de proteínas suas inibidoras, as TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases - inibidores tecidulares de metaloproteases). Há quatro tipos de TIMPs (1-4) (Sternlicht & Werb, 2001). Paradoxalmente, estas TIMPs, particularmente a TIMP-1, quando têm elevada expressão nos tecidos ou no soro, estão associadas com valores elevados do sHER-2 e a tumores com pior prognóstico (Schrol *et al.*, 2004; Kuvaja *et al.*, 2007; Tsal *et al.*, 2011). Tal pode estar associado a uma ativação do HER-2 independente das MMP (Tsal *et al.*, 2012), como indução da proliferação celular (Stetler-Stevenson, 2008) e inibição da apoptose por ativação do PI-3K, por exemplo (Liu, Bernardo, Fridman & Kim, 2003).

Além da clivagem proteolítica, o sHER-2 também pode aumentar devido a outros fenómenos, nomeadamente por intermédio de *alternative splicing* (processamento alternativo). A primeira forma “mutante” desta maneira é uma variante de mRNA com 2,3 kb que codifica uma proteína intracelular com cerca de 100 KDa, composta pelos primeiros 633 aa, forma esta associada à resistência aos anticorpos terapêuticos (Scott *et al.*, 1993; Tsé *et al.*, 2012). A outra forma é a herstatina, uma variante de *splicing* que codifica para uma proteína solúvel de 68 KDa já referida anteriormente. Os testes atualmente existentes não permitem distinguir o sHER-2 de shedding do sHER-2 resultante de *alternative splicing* (Tsé *et al.*, 2012).

4.5.2. Utilidade do sHER-2

➤ 4.5.2.1. Indicador de prognóstico

Consentaneamente ao *status* HER-2 determinado no tecido, o sHER-2 também tem valor prognóstico.

Através de uma extensa revisão da literatura, englobando um conjunto vasto de artigos, Carney e colegas (2003) deixaram claro que a maioria dos artigos confirma que pacientes com TM possuíam uma correlação forte entre o aumento de sHER-2 e um prognóstico pior, nomeadamente, menor tempo até progressão (TTP - time to progression), menor OS e menor DFS. O 1º artigo a realçar este facto (Kandl, Seymour & Bezwoda, 1994), conclui que os pacientes com valores elevados de sHER-2 tinham pior OS que os pacientes com valores

normais de sHER-2. Posteriormente, realizou-se uma miríade de estudos, cujas conclusões foram semelhantes (Klein *et al.*, 1995; Carney *et al.*, 2003; Ludovini *et al.*, 2008), sendo que valores elevados de sHER-2 estão mais correlacionados com o prognóstico dos TMM (Lam *et al.*, 2012).

Além disso e dependendo dos estudos, os valores de sHER-2 poderão ter relevância antes do tratamento (níveis sHER-2 pré-tratamento elevados associados a pior OS, em TMM, segundo Bramwell *et al.*, 2009) ou só após o tratamento (Saghatchian *et al.* (2004) referem que os valores de sHER-2 só funcionam como fator de prognóstico independente após a terapêutica). Ainda acerca do interesse a nível prognóstico, o sHER-2 está associado a outros fatores, havendo uma correlação significativa entre o sHER-2, o tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos (Krainer *et al.*, 1997), o alto grau histológico, o estadio III e a negatividade para RE e RP (Ludovini *et al.*, 2008). De facto, em pacientes com sobreexpressão de HER-2 nos tecidos, o valor do sHER-2 está relacionado com o tamanho do tumor e com o envolvimento dos linfonodos, sendo que valores elevados do sHER-2 estão fortemente associados a tumores maiores que 5 cm de diâmetro e mais do que 3 linfonodos envolvidos (Molina *et al.*, 1996).

Outros estudos referem que os valores elevados de sHER-2 pré-cirúrgicos predizem a possibilidade de vir a desenvolver metástases, principalmente no fígado (Molina *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 2009) e que ajudam também a predizer o sítio de metastização (com metástases viscerais há 45% de TM com valores elevados do sHER-2 e com metástases não viscerais, 20% dos níveis apresentam valores elevados do sHER-2 - Hayes *et al.*, 2001). Outros locais de metastização que implicam um aumento dos níveis séricos de sHER-2 são: medula óssea e osso, pulmões, pleura, linfonodos axilar e outros (Wilking *et al.*, 2011).

A provar que estas evidências não são unânimes para toda a comunidade científica, existem alguns estudos que, para além de não apontarem relação entre a IHQ e o sHER-2, concluem que o sHER-2 não tem valor prognóstico (Quaranta *et al.*, 2006).

De facto, a ASCO ainda não recomenda a quantificação do sHER-2 para a avaliação do prognóstico (Harris *et al.*, 2007), apesar da National Academy of Clinical Biochemistry (Academia Nacional de Bioquímica Clínica, dos EUA) o recomendar (Sturgeon *et al.*, 2008).

➤ 4.5.2.2. Valor preditivo da resposta à terapêutica

De forma semelhante aos resultados obtidos pelas técnicas convencionais (como IHQ ou FISH), a concentração de sHER-2 tem um valor preditivo na resposta à terapêutica.

Em termos de terapêutica hormonal está descrito que as pacientes com TM que apresentam níveis elevados do sHER-2 têm uma menor taxa de resposta⁹ (Leitzel *et al.*, 1995; Carney *et al.*, 2003). Além de terem uma menor resposta à terapêutica, a duração da resposta é, também menor quando os valores do sHER-2 estão elevados (Lipton *et al.*, 2002; Lipton *et al.*, 2003). No que toca à quimioterapia clássica, a situação não é muito diferente, segundo a conclusão de vários estudos. Mehta *et al.* (1998) referem que os valores do sHER-2 em TMM, antes da quimioterapia (especialmente se houverem mais de 3 linfonodos positivos), são um fator preditivo da resposta à quimioterapia por CMF, sendo que TM com valores elevados do sHER-2 apresentam maior resistência.

Na mesma linha de pensamento, Colomer e colegas (2000), num estudo com TMM submetidos a doxorrubicina e paclitaxel, observam uma relação significativamente inversa entre os níveis do sHER-2, a resposta à terapêutica e a duração da resposta. Os autores sugerem mesmo que o sHER-2 seja melhor indicador que o *status* do HER-2 nos tecidos.

Carney *et al.* (2003) referem, contudo, que há uma tendência para afirmar que valores elevados de sHER-2 predizem uma relativa sensibilidade a antraciclinas e taxanos.

Vários estudos na Mulher, com pacientes a receberem trastuzumab, concluíram que com valores elevados de sHER-2 a taxa de resposta à terapêutica é maior (Esteve *et al.*, 2002; Dnistrian *et al.*, 2003; Kontani *et al.*, 2013), e que variações nos níveis do sHER-2 no decorrer do tratamento estavam correlacionadas com a resposta à terapêutica (Esteve *et al.*, 2002).

Outros estudos introduzem o conceito de “declínio significativo” (que pode até ser melhor biomarcador que o valor *baseline*¹⁰ - Lam *et al.*, 2012) que significa uma diminuição maior ou igual a 20% na concentração do sHER-2.

Quando há um “declínio significativo” nos níveis de sHER-2, a taxa de resposta em pacientes a receber trastuzumab é mais favorável, com maior duração da resposta e maior OS (Ali *et al.*, 2008). A mesma situação se aplica ao lapatinib, com maior PFS quando há um declínio significativo nos níveis do sHER-2 (Finn *et al.*, 2009).

Também Witzel *et al.* (2010) demonstraram haver relação entre a remissão completa e os valores elevados do sHER-2 e a diminuição de sHER-2 no decorrer do tratamento com trastuzumab. Vários autores chegaram à mesma conclusão para o lapatinib (Lipton *et al.*, 2011; Witzel *et al.*, 2012).

⁹ Quando se refere taxa de resposta, inclui-se nesse conceito a resposta completa (sem tumor residual ou carcinoma ductal *in situ* remanescente, em 4 semanas), a resposta parcial (mais de 50% de diminuição da soma dos dois diâmetros de tumor) e a doença estável (menos de 50% de diminuição da soma do produto de dois diâmetros do tumor (Lipton *et al.*, 2002 baseado em WHO, 1979).

¹⁰ O valor *baseline* refere-se ao valor medido antes da cirurgia ou da aplicação da terapêutica.

No entanto, Lennon *et al.* (2009) não encontraram relação entre o sHER-2 pré-tratamento e a resposta ao trastuzumab em TMM, posição apoiada por outros estudos (Tsé *et al.*, 2012) pondo em causa, mais numa vez, a utilidade deste biomarcador, como fator de discriminação para a aplicação de trastuzumab.

Ainda assim, Lam *et al.* (2012) afirmam que a avaliação de HER-2 por IHQ/FISH em conjunto com a quantificação do sHER-2 contribui para uma maior acurácia dos pacientes que são elegíveis para o tratamento com trastuzumab.

➤ 4.5.2.3. Papel sHER-2 na monitorização da terapêutica

Segundo uma revisão de 16 artigos, qualquer que seja a terapêutica administrada, as alterações dos níveis do sHER-2 seguem, em paralelo, o curso clínico da doença, ou seja, um aumento do sHER-2 indica progressão da doença e diminuição do sHER-2 indica resposta à terapêutica ou ausência da progressão da doença (Carney *et al.*, 2003).

➤ 4.5.2.4. Papel do sHER-2 no diagnóstico precoce de recidiva

Muitos estudos apontam para aumentos do sHER-2 antes de ser possível o diagnóstico clínico do tumor por radiografia ou tomografia computadorizada (Carney *et al.*, 2003).

De facto, valores elevados do sHER-2 predizem metástases em 27 e 50% dos casos, 6 e 3 meses, respetivamente, antes do diagnóstico clínico (Fehm *et al.*, 2002).

Tem sido reportada uma boa correlação entre níveis aumentados do sHER-2 e a recidiva/progressão da doença (Sørensen *et al.*, 2009). Adicionalmente, o sHER-2 em pacientes com doença avançada está relacionado com o local da recidiva, pois metástases distantes (especialmente as hepáticas) têm valores maiores de sHER-2, em relação às recidivas loco-regionais (Molina *et al.*, 1996).

Isoladamente ou em conjunto com outros biomarcadores tumorais, como o CEA e o CA 15-3¹¹, o sHER-2 poderá ser um bom biomarcador para detetar precocemente a recidiva dos TM (Carney *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2009), chegando a ser, segundo certos autores, um biomarcador mais fiável que o *status* tecidular do HER-2 (Harris *et al.*, 2001).

4.5.3. Quantificação do sHER-2

A técnica mais utilizada é, de longe, a ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Nesta técnica existe um anticorpo anti-HER-2 (anticorpo de captura) adsorvido na superfície da placa, cobrindo-a. Após se incubar o soro dos pacientes, o sHER-2 existente ligar-se-á ao

¹¹ CEA: carcinoembryonic antigen – antígeno carcino-embrionário; CA 15-3: carbohydrate antigen 15-3 – antígeno carbo-hidrato 15-3, associados com carga tumoral e pior prognóstico (Park *et al.*, 2008).

anticorpo de captura (numa polistireno *bead coated* - Sugano *et al.*, 2000), ficando retido, não sendo removido com as lavagens. Posteriormente, faz-se uma segunda incubação com outro anticorpo, também anti-HER-2 (anticorpo de deteção), acoplado a HRP, formando um complexo trimérico (Ac-Ag-Ac, designada “sandwich”). Depois, adiciona-se um substrato que reage com a HRP, originando um produto colorido em quantidade proporcional à concentração do sHER-2. Por fim, a absorvância é medida por espectrofotometria (James *et al.*, 2008).

As vantagens desta técnica residem no facto de: ser pouco invasiva, permitir a monitorização do paciente de forma a avaliar a evolução clínica (Siemens HealthCare®, 2013), ser objetiva, ser fácil de executar (automatizada), ser rápida e ser reprodutível (Leyland-Jones & Smith, 2011). Em termos de desvantagens, esta técnica enzimática apresenta algumas incompatibilidades com os anticorpos usados na terapêutica (caso permaneçam em circulação), por competirem com os 2 anticorpos da técnica (Payne *et al.*, 2000).

Mais recentemente, uma variação desta técnica tem vindo a ser mais aplicada, designada de CLIA (chemiluminescence immunoassay). É mais sensível e se, porventura, houver anticorpos terapêuticos em circulação, não interferem com o ensaio, uma vez que se ligam a epítomos diferentes (Hayashi *et al.*, 2012). À semelhança do ELISA, utiliza dois anticorpos monoclonais, um de captura, na fase sólida, conjugado com FAS e um marcado com fluoresceína, ambos específicos para epítomos específicos do DEC de HER-2 (Esteva *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2012). Através da fluoresceína, produzir-se-á uma quimioluminescência, proporcional à quantidade de sHER-2 presente na amostra e determina-se o valor do sHER-2 (Kong *et al.*, 2006). O nível em cada amostra clínica é calculado a partir de uma curva padrão, construída com base em soluções de proteína recombinante de DEC de concentração conhecidas (Sugano *et al.*, 2000).

Um dos testes de CLIA mais utilizados é o da Siemens HealthCare, ADVIA Centaur®, em que o limiar de positividade aconselhado é de 15 ng/ml. Este *kit* tem um intervalo de deteção entre os 0,5 e os 300 ng/ml. Segundo o fabricante, 95% dos indivíduos saudáveis têm valores de sHER-2 abaixo de 15 ng/ml.

Uns dos inconvenientes dos imunoensaios são os falsos resultados causados por anticorpos anti-espécie, como os HAIAs (Human Anti-animal Ig Antibodies), incluindo auto-anticorpos que se ligam aos anticorpos purificados de animais (rato ou coelho) por reatividade cruzada e que causam interferência nestes ensaios (Lam *et al.*, 2012). Um desses exemplos são os HAMAs (Human Anti-Mouse antibodies - anticorpos humanos anti-rato) (Kricka, 1999), gerados através do contacto com imunoglobulinas murinas ou pela presença de auto-anticorpos humanos com reatividade cruzada (Lam *et al.*, 2012).

A presença destes dois tipos de anticorpos pode resultar em falsos positivos, quando os HAIA não específicos fazem *cross-link* com os anticorpos de captura e sinal por ligação à sua porção Fc (Klee, 2000) ou originar falsos negativos, quando os HAIA se ligam ao anticorpo de captura, de tal modo que impedimentos estereoquímicos não permitem a formação de complexos antígeno+anticorpo de sinal.

No entanto, existem formas de evitar a interferência dos HAIA:

- Remover as imunoglobulinas endógenas das amostras de soro, com polietilenoglicol, por exemplo (Ismail, 2005);
- Usar reagentes de bloqueio derivados de Ig-G murinas, como o IIR (Imunoglobulin inhibiting reagent - reagente de inibição de Ig) ou o HBR (heterophilic blocking reagent - reagente bloqueador heterofílico), que se ligam aos Ac heterofílicos de forma a diminuir a sua interferência nos imunoensaios (Reinsberg, 1996);
- Substituir Ac por agentes de detecção de natureza não imunoglobulínica (Andersson, Rönmark, Areström, Nygren & Ahlborg, 2003);
- Usar tampão de bloqueio para diluir as amostras de soro, de forma a prevenir a interação dos HAIA com o alvo, mas não a interação forte entre os Ac de captura/detecção e antígenos específicos, anulando assim as ligações não específicas e, por acréscimo, os falsos resultados (Zhang *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2012).

A escolha do *cutoff* a utilizar é uma das maiores fontes de divergência entre grupos de investigação. O *cutoff* mais utilizado é 15 ng/ml, e apesar de ter uma boa especificidade, tem uma sensibilidade moderada. Quando se reduz o *cutoff* para 10 ng/ml, temos 72% de sensibilidade e 85% de especificidade (Witzel *et al.*, 2010). Quando se aumenta o *cutoff* para 37 ng/ml, a sensibilidade diminui (62%), mas a especificidade aumenta (95%) (Kong *et al.*, 2006).

Como exercício académico e para aprofundar este trabalho neste tema, descrevem-se, de seguida, três técnicas usadas para determinar o sHER-2, apesar de não terem, para já, utilização rotineira em clínica.

Uma das técnicas, apelidada de PEMS (Piezoelectric Microcantilever Sensors), baseia-se em sensores piezoeléctricos de *microcantilevers*, cujo mecanismo tem por base alterações na sua frequência de ressonância devido à ligação a proteínas, conseguindo detetar vários biomarcadores proteicos, dos quais se destaca, obviamente, o sHER-2 (Loo *et al.*, 2011). Apresenta uma camada piezoeléctrica com Ac monoclonais anti-HER-2, conseguindo detetar baixas concentrações de sHER-2. Foi validada com um *kit* ELISA (Loo *et al.*, 2011).

Na técnica FACTT (Fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique), o antígeno de interesse (sHER-2) é capturado por “plate-associated antibodies” e detetado por Ac acoplados a uma “double-stranded ADN template”, que acomoda a enzima T7 ARN polimerase. A interação com a polimerase leva à produção de transcritos que são quantificados por um “fluorescent ARN intercalating dye” (Zhang *et al.*, 2006). É cerca de 1000 vezes mais sensível que a ELISA e não tem os problemas de *background noise* como na ELISA (Lam *et al.*, 2012).

Por último, o *Dot Blot*, sobre o qual incide a parte prática deste estudo. O *Dot Blot* é uma técnica clássica utilizada para detetar, analisar e identificar proteínas. Por *blot*, entende-se qualquer membrana com proteína imobilizada. Esta técnica tem similaridades com a técnica de *Western Blot*, mas não implica separação por electroforese, pois as amostras (o soro) são *spotted* numa membrana apropriada (ver figura 9), em grelhas previamente definidas (Moore, 2009). Assim, vai haver uma transferência das proteínas (microfiltração) do soro para a membrana (fase sólida - suporte), por capilaridade, auxiliada por vácuo, eventualmente. Posteriormente, adiciona-se o anticorpo primário anti-HER-2 (anti-DEC) e, após as lavagens, o anticorpo secundário conjugado com HRP (anti-imunoglobulinas, específico para isótipo e espécie onde o Ac primário foi produzido; se o Ac primário é de coelho, o Ac secundário será uma imunoglobulina anti-coelho, de espécie diferente). Culminando a técnica de imunodeteção, adiciona-se o ECL (enhanced chemiluminescence), o substrato do HRP, que vai servir de reagente de deteção, por originar uma reação química (oxidação do luminol na presença do peróxido de hidrogénio) que emite luz, que é aumentada cerca de um milhar de vezes (“enhanced”). Essa luminescência vai ser, então, capturada por uma película de Raios-X, originando um *dot*, cuja intensidade será proporcional ao sHER-2 existente no soro. A luminescência que emana da membrana pode, também, ser detetada por uma câmara, que transforma o sinal numa imagem digital, através de um *software* próprio (Thorpe & Kricka, 1986; Shewry & Fida, 1996; Abcam©, 2012).

A imunodeteção neste caso é por quimioluminescência (as outras formas possíveis são os métodos fluorescentes, colorimétricos (com DAB), quimiofluorescentes e radioactivos, cujas definições fogem ao âmbito deste trabalho), que não comporta os riscos associados ao material radioativo ou à toxicidade de substratos cromogénicos (como o DAB) (Cell Signaling Technology, 2013).

As vantagens da técnica de *Dot Blot* residem na sua extrema facilidade de execução, não ser dispendiosa (usa menos Ac que o ELISA, não precisa dos AC pré-coating e usa menos reagentes), é rápida, reprodutível e pode aplicar-se a um número grande de amostras. Adicionalmente os resultados ficam perpetuados numa película (Cell Signaling Technology,

2013; Tan *et al.*, 2011). Em termos logísticos, a técnica pode ser automatizada ou semi-automatizada (como o Bio-Dot System®, da Bio-Rad®).

Comparado com a técnica de ELISA, tem uma especificidade de 95,3%, uma sensibilidade de 65% e concordância de 86%. Comparativamente à IHQ, tem uma concordância de 69% (Tan *et al.*, 2011).

Acresce que estes autores realizaram, até à data, o primeiro e o único estudo para deteção do sHER-2 por *Dot Blot*, obtendo valores elevados do sHER-2 em 25% dos casos de carcinomas ductais não invasivos e em 35,2% em carcinomas ductais invasivos. Foram ainda relacionados valores elevados de sHER-2 com um alto grau histológico e com negatividade para os RE (Tan *et al.*, 2011).

Em termos de desvantagens, é uma técnica semi-quantitativa, o sistema de classificação dos *dots* (manchas) é de alguma forma subjetivo, não sendo a técnica mais sensível e específica.

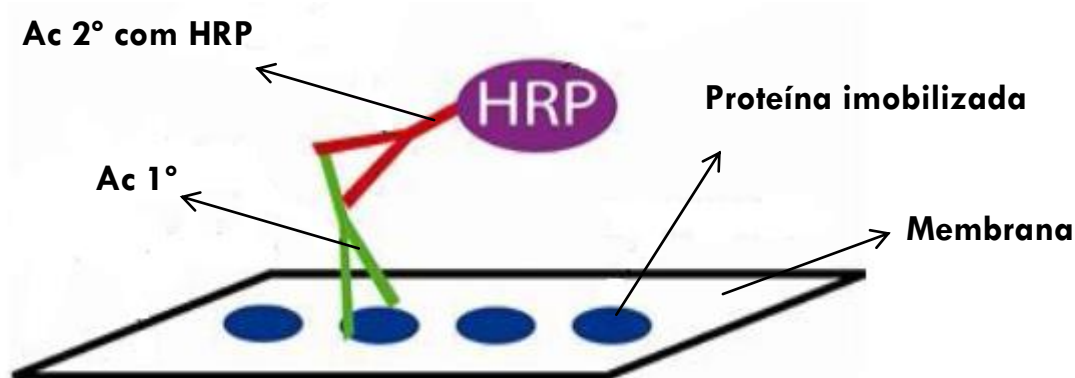


Figura 9 – Representação esquemática do método de *Dot Blot* (adaptado de G-BioSciences, 2013)

Parte II) Otimização da técnica de *Dot Blot* para quantificação do sHER-2 em TMF HER-2+

1) Materiais e métodos

1.1. Pacientes e espécimens

As amostras biológicas utilizadas no estudo foram recolhidas em fêmeas da espécie felina. Foi recolhido um primeiro grupo de sangues, provenientes de 42 animais saudáveis (sem TM ou outro tipo de afeção conhecida), destinados a servirem de controlo negativo nos ensaios. Afim de minimizar tanto quanto possível o nível de stress, o sangue foi recolhido em gatas que se deslocaram ao Hospital Escolar da FMV-UL para fazer OVH. Neste sentido, aquando da cateterização (para submeter o animal a fluidoterapia), já sob anestesia, procedeu-se à recolha de 1-2 ml de sangue.

Num segundo grupo de recolhas, foi retirado sangue a 42 gatas com adenocarcinomas mamários (com e sem metástases), que vinham ao Hospital Escolar da FMV-UL para realizarem mastectomia para exérese da massa tumoral. O procedimento de recolha do sangue deste segundo grupo foi realizado de forma igual à recolha descrita anteriormente.

A existência de metástases foi avaliada por radiografia ou através de TAC (na eventualidade de metastização em curso, optava-se por não fazer cirurgia) e foram realizadas análises sanguíneas pré-cirúrgicas.

Nas gatas com TM foram recolhidos vários dados referentes ao animal e ao historial clínico: idade; estado reprodutivo; tamanho do tumor e outros dados macroscópicos (ulceração, tipo de secreção, em que cadeia estava localizado, número de nódulos, móveis ou aderentes); análise histopatológica do TM (grau malignidade, existência ou não de invasão vascular, invasão de pele/mucosa, ulceração, unifocal ou multifocal, forma regular ou irregular, necrose e avaliação do linfonodo eferente para metástases); data do óbito (se fosse o caso) e informações da necrópsia (caso houvessem).

Todas as amostras sanguíneas foram recolhidas de veias periféricas (veia cefálica ou safena), para um tubo seco (sem anti-coagulante). O sangue foi centrifugado a 3000 G, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e o soro foi recolhido para alíquotas de 0,5 ml., devidamente identificadas e armazenadas a -80°C.

Uma porção das massas tumorais retiradas foi fixada em formalina tamponada a 10%, durante 24-48 horas, processada e depois foram realizados vários cortes, afim de se poder fazer o diagnóstico HP do TM de acordo com classificação da WHO (Misdorp *et al.*, 1999). Este procedimento foi realizado no laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL.

1.2. Imunohistoquímica

Após a análise HP dos TM removidos cirurgicamente, foi realizada a IHQ para verificar a expressão de HER-2, RE, RP e Ki67, de forma a classificar molecularmente os TMF.

Os TMF foram classificados de acordo com os critérios para IHQ da ASCO (2007), relativamente ao *status* HER-2 (mencionados na página 45 desta monografia) e ao *status* dos RE e RP. Para estes últimos (Hammond *et al.*, 2010) os TM são considerados positivos caso o número de núcleos de células tumorais imunoreativas for maior ou igual a 1%.

A IHQ para HER-2 foi realizada em tecidos parafinados, fixados em formalina tamponada a 10%, o que implicou a sua desparafinação e re-hidratação (em xilol e, posteriormente, em concentrações decrescentes de etanol - 100%, 95% e 70%). A recuperação antigénica foi feita com tampão citrato em panela de pressão (2 atm, durante 2 minutos, a pH de 6) e o bloqueio das proteínas com reagente próprio da DAKO®. Posteriormente, procedeu-se a incubação com anticorpo primário, seguida do bloqueio pós-primário e depois a incubação com anticorpo secundário. Para a revelação, usou-se o cromogénio (DAB). Por fim, os tecidos foram corados com hematoxilina de Mayer.

1.3. Cultura de células e Western Blot

Foram utilizados no *Dot Blot* extratos de linhas celulares que se sabe sobreexpressarem o oncogene HER-2, tendo servido, portanto, de controlo positivo.

Uma dessas linhas celulares (SKBR3) é oriunda de uma mulher com adenocarcinoma mamário, comprada à American Type Culture Collection – ATCC®. Estas células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), suplementado com soro fetal bovino a 10%, L-glutamina, penicilina e estreptomicina.

As outras linhas celulares foram obtidas a partir da Gata: FYCp, isolada a partir de um TMF túbulopapífero (Maniscalco *et al.*, 2013); a FCLu (fibroblastos de pulmão normal felino); a FMCp (linha a partir de adenocarcinoma mamário, lesão primária) e FMCm (linha obtida de uma lesão metastática de adenocarcinoma mamário). Estas linhas celulares de gata foram obtidas através de investigadores japoneses (Uyama *et al.*, 2005).

Foi, inicialmente, realizado um *Western Blot*, onde se verificou que os vários anticorpos usados na IHQ reconheciam especificamente a proteína HER-2 da gata (de realçar que os anticorpos foram desenvolvidos para epítomos humanos, homólogos à sequência felina).

Estes dois passos, relativos à caracterização de linhas celulares e ao *Western Blot* foram realizados antes do estágio de mestrado se ter iniciado, pela Doutora Maria João Soares, da FMV-UL.

1.4. Dot Blot

Como já referido, a técnica de *Dot Blot* tem como objetivo principal a deteção e identificação de proteínas. Sendo simples e fácil de executar, tem por base uma série de passos comuns na sua aplicação, cujo protocolo geral apresenta os seguintes passos:

1. Preparação da membrana de transferência, geralmente construindo uma grelha na membrana, a lápis, para demarcar a área onde se faz a pipetagem da amostra;
2. Pipetar (com auxílio de micropipeta) a amostra, para o respetivo quadrado da grelha marcada anteriormente. Ter o cuidado de colocar o líquido o mais perto possível do centro do quadrado;
3. Deixar a membrana (com as amostras pipetadas) secar;
4. Proceder ao bloqueio da membrana através da sua incubação numa solução (por exemplo, BSA a 1%), durante 30-60 minutos;
5. Incubação da membrana com o anticorpo primário (anti-HER2), desde uma hora até *overnight* (pelo menos 16 horas);
6. Posteriormente, fazer três lavagens (5-10 minutos cada com tampão TBS-T);
7. Incubar a membrana com o anticorpo secundário, conjugado a HRP;
8. Repetir o passo das lavagens (passo 6);
9. Incubar a membrana com ECL durante 1-4 minutos e remover o excesso com papel de filtro;
10. Exposição numa película de Raios-X, com vários tempos de exposição;
11. Comparar o sinal da amostra com as diluições padrão.

1.4.1. Material utilizado

- TBS (Tris buffered saline) é uma solução tampão isotónica, não tóxica para as células, com vasta utilização em biologia molecular (em técnicas como ELISA, IHQ e *immunoblotting*), quer como agente diluidor ou como agente de lavagem.

Pode ter, ou não, adicionado um detergente, como o Tween 20. Tween 20 (ou polisorbato 20) é um surfatante, não iónico, sendo quimicamente éster de sorbitol de polioxietileno. Tem também ação como agente emulsificador, na pré-extração de membranas ao remover as proteínas periféricas, como agente de bloqueio e na lise de células (Sigma[®], 2012).

No decorrer deste trabalho, utilizou-se TBS-Tween 20 a 0,05% (TBS-T) para as soluções de lavagem, bloqueio e do anticorpo primário e usou-se TBS (sem Tween) para diluir o anticorpo secundário.

De referir que os detergentes podem inibir a ligação das proteínas à membrana de transferência, pelo que o tampão de bloqueio e de lavagem não devem ter mais de 0,05% de Tween 20 (Millipore[®], 1997).

- Anticorpos:

- Primários: o A0485 é um anticorpo policlonal de coelho, dirigido contra epítomos da porção intra-citoplasmática (ou seja, do DIC) (Manion, Hornick, Lester & Brock, 2011). Aplicado em estudos de IHQ, mostra uma sensibilidade de 92,6% e uma especificidade de 98,8% na deteção de TM HER-2+ (Yaziji *et al.*, 2004).

O clone 4B5 é um anticorpo monoclonal de coelho que, tal como A0485, reconhece o DIC (Ventana, 2011).

Por último, o clone SP3, que é um anticorpo monoclonal de coelho que reconhece, contrariamente aos supracitados, o DEC. Em ensaios de IHQ, SP3 apesar de ter uma alta especificidade (99%), tem uma sensibilidade moderada para HER-2 (52%) (Ricardo *et al.*, 2007). Tal pode dever-se ao facto de a clivagem do DEC provocar falsos negativos na deteção com o anticorpo SP3 (Ricardo *et al.*, 2007).

Estes anticorpos haviam sido previamente utilizados em tecidos de Gata, para ver se reconheciam o HER-2 nesta espécie, uma vez que esses anticorpos foram desenvolvidos para a espécie humana. Apenas o SP3 não deu sinal específico, o que se pode dever ao facto de o DEC ser mais alterado pelo formol que o DIC ou ao próprio *shedding* do recetor (Soares *et al.*, 2013).

Os anticorpos monoclonais são, geralmente, menos sensíveis, uma vez que este tipo de anticorpos é produzido por um único tipo de clones de linfócitos B, só reconhecendo um epítopo do antígeno. Já os anticorpos policlonais são mais sensíveis, porque são derivados de diferentes linhagens de células B, constituindo um *pool* misto de moléculas de imunoglobulinas que se ligam a diferentes epítomos do mesmo antígeno, facilitando a deteção da proteína alvo (Moore, 2009). Como principal desvantagem, os anticorpos policlonais mostram menor especificidade através do aparecimento de *background* ou marcação inespecífica (Rossi *et al.*, 2005).

- Secundários: em termos de anticorpos secundários, foi utilizado um anticorpo secundário anti-coelho, conjugado com HRP.

- Água miliQ: algum do sucesso potencial dos vários trabalhos de investigação decorre da qualidade da água utilizada, cuja purificação é um fator importante. Assim, é necessário utilizar água ultra-pura, à qual tenham sido removidos vários contaminantes (pirógenos, nucleases, bactérias, partículas, substâncias orgânicas, etc.) Esta água ultra-pura é de maior qualidade que a água destilada. O aparelho de purificação utilizado (MiliQ Water

Purification System[®]) funciona com um filtro de 0,2 µm, gerando água que pode ser utilizada como tampão, em lavagens e na preparação de vários reagentes. A água ultrapura usada é purificada com uma resina de troca iônica, com carvão sintética ativado e passada por uma lâmpada UV (Millipore[®], 2013).

- BSA (Bovine serum albumin): a albumina sérica bovina é uma cadeia polipeptídica simples, utilizada como agente de bloqueio. É diluída em TBS-T, tendo sido utilizada a 1%.
- ECL: família de reagentes quimioluminescentes, com grande sensibilidade (Millipore[®], 2013).
- 3x DB: este tampão utilizado na diluição dos soros inclui Tris (tris (hidroximetil) aminometano), SDS a 6,8% (confere propriedades desnaturantes), glicerol a 33% e bromofenol para dar cor.
- Película de Raios-X: película especialmente concebida para ensaios de *immunoblotting* (*Western Blot* e *Dot Blot*), passível de ser utilizada em substratos com deteção pelo ECL para HRP e AP (Thermo-Scientific[®], 2013).

2) Resultados

2.1. Otimização da técnica de *Dot Blot*

Apesar da arquitetura genérica da técnica, consoante a proteína que se pretende analisar, há variações que terão, eventualmente, que ser feitas. Além do mais, esta técnica só foi utilizada uma vez para análise do sHER-2 em humanos, de modo que foi preciso proceder à sua otimização. Os passos otimizados foram relativos a:

- Membranas a serem utilizadas (PVDF ou nitrocelulose);
- Secagem em estufa ou à temperatura ambiente;
- Processo de microfiltração manual ou auxiliado por vácuo;
- Anticorpo primário: clone, diluição e tempo de incubação;
- Anticorpo secundário: diluição e tempo de incubação;
- Quantidade de soro a pipetar;
- Tempos de exposição;
- Congelação/descongelação da amostra;
- Qualidade da amostra;
- Reprodutibilidade.

Membranas: ponderou-se acerca da utilização de membranas de nitrocelulose ou de PVDF (polyvinylidene difluoride - difluoreto de polivinilideno).

As membranas PVDF são hidrofóbicas, o que faz delas um excelente suporte para aplicação em *Dot Blotting*. Tem como pré-requisito essencial, devido à sua natureza hidrofóbica, demolhar-se previamente em álcool (geralmente metanol a 100%), passando de opacas a transparentes. Destacam-se como características a sua elevada afinidade para proteínas (mesmo quando estas existem em pouca quantidade na amostra), a sua estabilidade química e uma elevada resistência mecânica (Bio-Rad®, 2012). Adicionalmente, este tipo de membranas pode ter poros com 0,45 µm de diâmetro (usadas na maior parte dos ensaios, como no caso de sHER-2, devido ao tamanho da proteína) ou com 0,2 µm (usadas para proteínas de baixo peso molecular).

Relativamente às membranas de nitrocelulose, importa referir que a ligação proteica a este tipo de membranas é instantânea e quase irreversível. Apresentam também as 2 tipologias de poros, como as membranas PVDF. Ao contrário destas, não precisam de ser demolhadas previamente em metanol, podendo ser em solução aquosa (não são hidrofóbicas). São mais frágeis mecanicamente que as de PVDF (Bio-Rad, 2012).

No início do trabalho experimental, foram analisados os 2 tipos de membrana. Nesse sentido, foi efetuada a técnica de *Dot Blot* com a mesma amostra positiva para HER-2 (SKBR3), usando a mesma concentração de anticorpos e

com os mesmos tempos de incubação e de lavagem (ou seja, todas as condições iguais), afim de se aferir qual seria a melhor membrana para a deteção de sHER-2.

Foi possível concluir que com as membranas de nitrocelulose foram obtidos melhores resultados, com *dots* mais uniformes, regulares e homogêneos. Pelo contrário, nas membranas PVDF, parecia que as proteínas se espalhavam mais pela membrana, gerando *dots* irregulares, disformes e heterogêneos (ver figura 10).

Secagem: à temperatura ambiente ou na estufa (37°C). Compararam-se 2 *Dot Blots* com extratos celulares HER-2+ (SKBR3), ao invés de se usarem amostras de soro. Todas as condições foram mantidas, com exceção de uma membrana que foi secada à temperatura ambiente e a outra na estufa, a 37° C.

Num primeiro ensaio, os *blots* secos na estufa não tiveram marcação na membrana de nitrocelulose e os realizados na de PVDF ficaram com *dots* pouco uniformes (como já foi

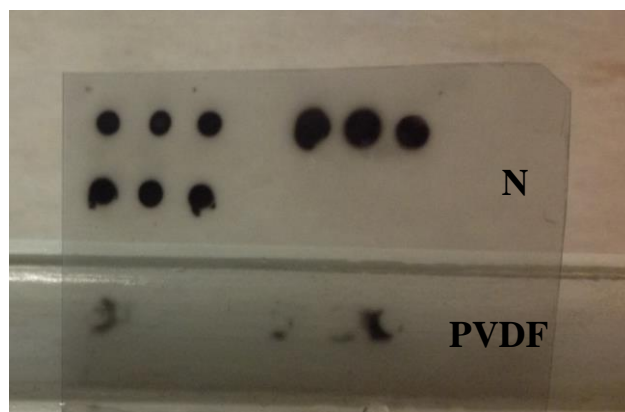


Figura 10 – Imagem de um ensaio de *Dot Blot*, representando a película de Raios X correspondendo a uma membrana de nitrocelulose (N) e uma membrana de PVDF (PVDF).

referido). Já os secos à temperatura ambiente revelaram o seguinte: os *dots* de PVDF mostraram uma distribuição pouco uniforme e com baixa intensidade de marcação, enquanto a membrana de nitrocelulose mostrou *dots* bem marcados, regulares e uniformes (figura 11).

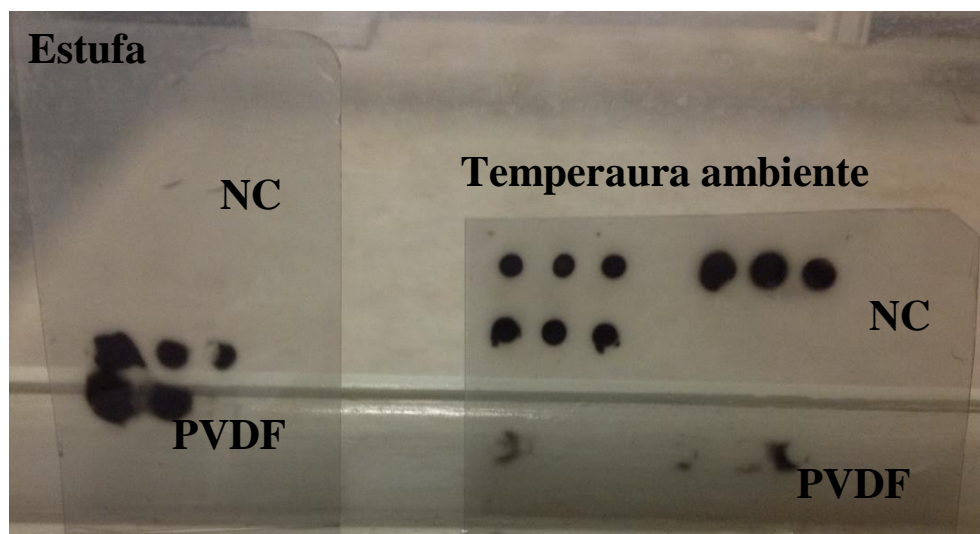


Figura 11 – Fotografia de 4 ensaios de *Dot Blot*, fazendo a comparação entre a secagem na estufa e a secagem à temperatura ambiente, com utilização dos dois tipos de membranas (PVDF e Nitrocelulose - NC) em cada tipo de secagem.

Após um par adicional de ensaios, onde foi utilizada a secagem à temperatura ambiente que, no geral, apresentava bons resultados, percebeu-se que estes podiam variar de acordo com as condições climáticas. Assim, a secagem na estufa, com a temperatura padronizada a 37°C oferecia maiores garantias de rapidez e de homogeneidade dos resultados. Logo, foi escolhido fazer-se a secagem das membranas sempre na estufa, durante uma hora, com base nos melhores resultados que se foram, progressivamente, obtendo.

Microfiltração: outra das vertentes estudadas foi se a microfiltração seria manual ou auxiliada por um aparelho de vácuo.

Para submeteter as membranas a pressão de vácuo utilizou-se um aparelho, (SNAP i.d.[®], da Millipore Corporations[®]), usado em várias técnicas de *immunoblotting*, como o *Western Blot* e o *Dot Blot* (figura 12). Segundo o fabricante, o SNAP i.d.[®] pode ser utilizado na

fase de bloqueio, nas lavagens e na incubação com o anticorpo primário e com o secundário.



Figura 12 – Imagem referente ao aparelho de vácuo Snap i.d.[®] (Millipore[®], 2012).

O aparelho consiste numa espécie de grelha, onde se colocam e fixam as membranas. Posteriormente, encaixa-se a grelha ao aparelho, em cuja concavidade são adicionadas as várias soluções (bloqueio, lavagem, anticorpos), que são aspiradas por vácuo, através das membranas, conseguindo-se diminuir, drasticamente, os tempos de bloqueio, de lavagens e de incubações (Gutierrez *et al.*, 2008; Millipore[®], 2012). O vácuo facilita a penetração dos fluidos pelos poros mais rapidamente (em segundos). Adicionalmente, a força do vácuo pode diminuir o *background*, pois promove a remoção de quaisquer anticorpos residuais que não estejam ligados.

Foi observado que aplicando as soluções de bloqueio, de lavagem e de anticorpos no aparelho de vácuo, os *dots* ficavam irregulares e não circulares na membrana (figura 13).



Figura 13 – Ensaio em PVDF com sistema de vácuo.



Figura 14 – Ensaio em membrana de nitrocelulose, só com as lavagens no sistema de vácuo.

Depois disso, optou-se por fazer só as lavagens no Snap. i.d. Como os resultados não se mostraram promissores (havia muito *background*; figura 14), a partir dessa altura, procedeu-se à lavagem manual, não se utilizando o vácuo em qualquer ensaio.

Anticorpo primário: Como anticorpos primários, utilizámos três tipos de clones de anticorpos anti-HER2: o clone A0485 (Dako), o clone 4B5 (Ventana) e o clone SP3 (NeoMarkers).

Foram experimentados inicialmente dois anticorpos: 4B5 e A0485, com resultados semelhantes, indicando que reconheciam o sHER-2 no soro da gata (figuras 15 e 16).

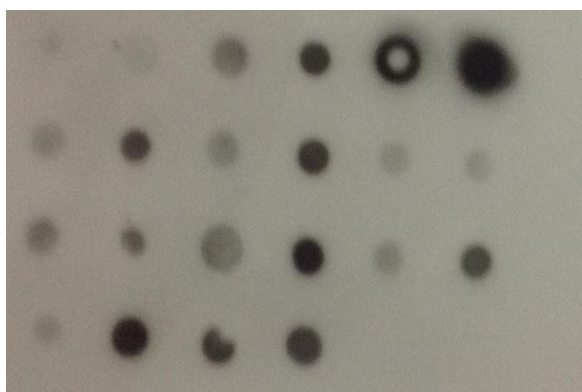


Figura 15 – Ensaio de *Dot Blot* realizado com o anticorpo A0485.

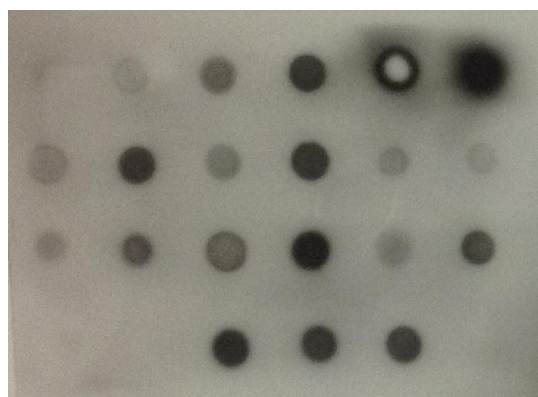


Figura 16 – Ensaio de *Dot Blot* realizado com o anticorpo 4B5.

Subsequentemente, uma vez que os resultados eram muito semelhantes, optou-se por utilizar o clone 4B5, por não ser tão oneroso.

Posteriormente, quando da utilização da proteína recombinante do DEC do HER-2 humana, utilizada para a obtenção das diluições padrão, os clones 4B5 e A0485 não marcaram, provavelmente por não reconhecerem o DEC da proteína recombinante humana.

Foi então testado o anticorpo SP3, que reconhece o DEC do HER-2, com detecção da proteína HER-2 recombinante humana.

Importa referir, ainda, que a disponibilidade apropriada dos anticorpos é crítica, sendo necessário determinar qual a concentração ótima. De facto, se o *blot* for incubado com concentrações de anticorpos subótimas, resulta numa menor detecção da proteína de interesse. Pelo contrário, se o *blot* for incubado com concentrações de anticorpos demasiado elevadas, há ocorrência de *background*, e o sinal específico pode saturar (Millipore©, 2012).

Assim, começou por otimizar-se as concentrações para o 4B5, usando as diluições de 1:10 e 1:20 (em solução de bloqueio) nos soros recolhidos. Como foram obtidos bons resultados (sem sub ou sobresaturação de sinal) nas duas concentrações testadas (figuras 17 e 18), decidiu-se passar a usar a diluição de 1:20, permitindo a poupança de anticorpo.

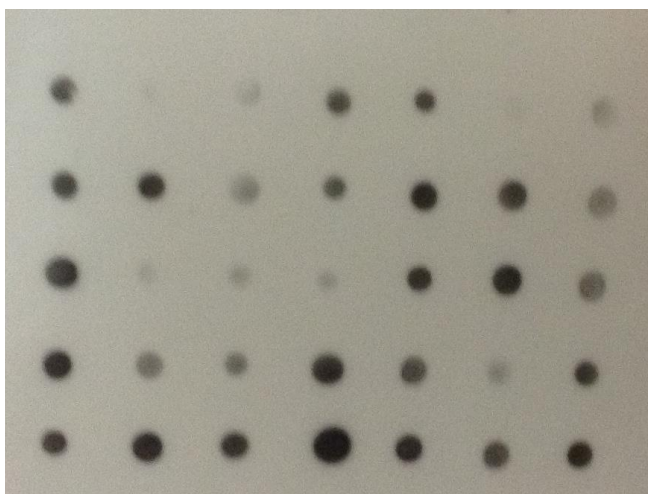


Figura 17 – Ensaio de *Dot Blot* com soros de Gata incubados com 4B5 à diluição 1:10.

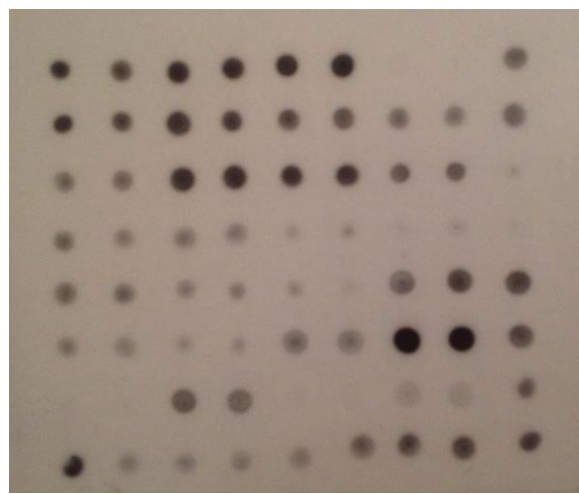


Figura 18 – Ensaio de *Dot Blot* com soros de Gata, incubados com 4B5 à diluição 1:20.

O A0485 foi utilizado com a diluição de 1:3000, com bons resultados e o SP3 (figura 19) na diluição de 1:500, também com bons resultados.

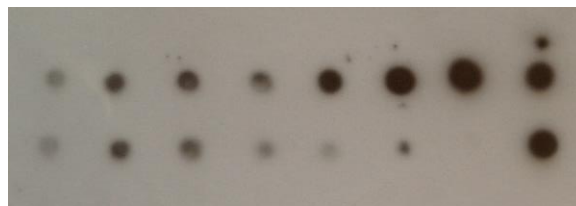


Figura 19 – Ensaio de *Dot Blot* com utilização do anticorpo SP3.

O tempo de incubação do anticorpo primário, nas escassas vezes em que se usou o aparelho de vácuo SNAP i.d., foi de 10 min. Depois, ficou estabelecido fazer-se incubação *overnight* (pelo menos dezasseis horas), no método manual, com bons resultados. Assim, as membranas ficavam num agitador de forma a garantir uma distribuição homogênea do anticorpo por toda a membrana, a 4°C de temperatura, para não haver degradação do sHER-2 por contaminação bacteriana (Abcam®, 2012).

Anticorpo secundário: começou por se testar a diluição de 1:35.000, em TBS (figura 20). A existência de elevado *background*, levou-nos a considerar o uso de uma concentração mais baixa (1:70.000), que, no entanto, continuava a demonstrar algum *background* (figura 21). Foi então testada a diluição de 1:100.000, que mostrou bons resultados.

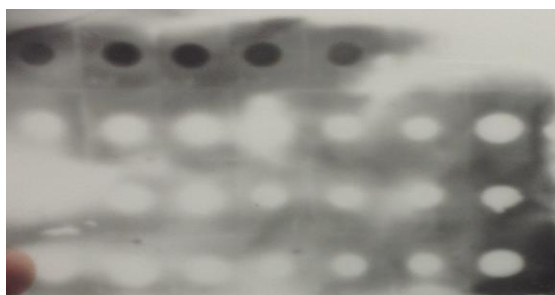


Figura 20 – Ensaio de *Dot Blot* com diluição de anticorpo secundário a 1:35.000.

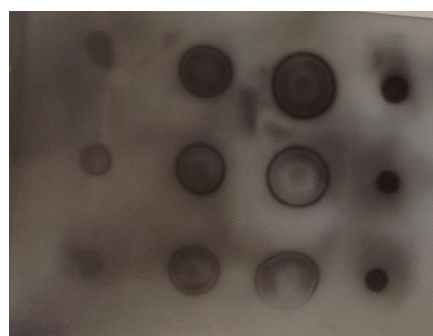


Figura 21 – Ensaio de *Dot Blot* com diluição de anticorpo secundário a 1:70.000.

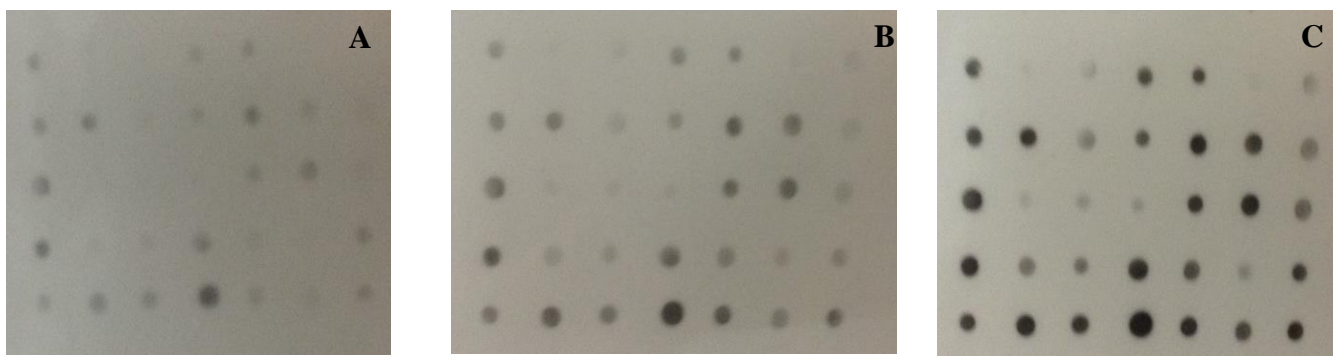
A duração do tempo de incubação do anticorpo secundário com a membrana ficou otimizada nos trinta minutos.

Lavagens da membrana: consistiam, em cada passo que eram aplicadas, numa sequência de 3 lavagens seguidas, com uma duração de dez minutos cada, tendo-se utilizado a solução tampão TBS-Tween a 0,05%. Quando se aplicou o aparelho de vácuo, cada lavagem demorava cerca de 10-15 segundos, sem que os resultados fossem tão bons quanto a lavagem manual. A finalidade das lavagens é retirar da membrana as moléculas residuais de anticorpos que não se tenham ligado. Atendendo a estes resultados, optou-se pela execução deste passo manualmente (Millipore®, 1997).

Bloqueio das membranas: foi selecionado o bloqueio com BSA a 1% durante trinta minutos. Este passo é muito importante, uma vez que a membrana tem elevada afinidade de ligação a proteínas. Assim, sem o passo do bloqueio, os anticorpos tenderiam a ligar-se à membrana inespecificamente, em vez de se ligarem à proteína pretendida, originando *background* devido

a fixação do anticorpo primário. É importante que o agente de bloqueio ocupe todos os locais da membrana não preenchidos de modo a que os anticorpos primários e secundários não se liguem de modo inespecífico à membrana. É igualmente importante que a solução de bloqueio não tenha afinidade para a proteína a detetar (neste caso, o sHER-2) e que não mostre reatividade cruzada com os anticorpos primários e secundários.

Revelação: na revelação aplicou-se ECL, de forma a cobrir toda a membrana, durante 4 minutos. Posteriormente, fez-se a exposição da membrana a películas de Raios-X, testando diferentes tempos.



Figuras 22 – Ensaio de *Dot Blot* com diferentes tempos de exposição: A - 90 segundos, B - 3 minutos e C - 5 minutos.

Impacto da congelação da amostra: como todas as amostras, quer os controlos saudáveis, quer os soros de gatas com TM, se encontravam armazenados a -80°C e iam sendo retirados, conforme eram necessários, havia a dúvida se a congelação e a descongelação sucessivas podiam alterar a concentração do sHER-2, interferindo com a obtenção dos resultados. Para avaliar esta hipótese, foram usados três soros que estavam congelados, descongelaram-se e foram pipetados para a membrana. De seguida, os soros foram congelados de novo a -80°C , descongelados e pipetados para a mesma membrana, e assim sucessivamente, perfazendo o total de cinco ciclos de congelação/dcongelação. Conforme é visível na figura 23, a congelação/dcongelação não teve um impacto assinalável na intensidade dos *dots* nos três soros testados.

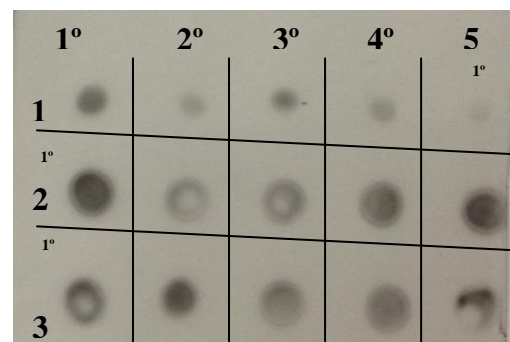


Figura 23 – Ensaio analisando o impacto da congelação em três soros diferentes (1, 2 e 3) durante 5 ciclos de congelação/dcongelação.

Quantidade de amostra: em termos da quantidade de amostra a pipetar foram testados vários volumes: $1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, $3\mu\text{l}$ e $5\mu\text{l}$ (figura 24). Todos os volumes deram origem a bons *dots*,

especialmente com o volume de 1 µl e tendo em conta que com este volume as membranas seriam menores e necessitariam de menos reagentes, optou-se por aplicar, doravante, este volume.

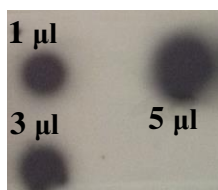


Figura 24 – Ensaio de pipetagem da amostra com 1 µl, 3 µl e 5 µl.

Volume: o volume das soluções de lavagem, de bloqueio ou dos anticorpos deve ser tal que permita à membrana ficar totalmente submersa na solução e que possibilite a sua deslocação livre, quando se coloca dentro de um recipiente, num agitador.

Qualidade das amostras: um fator que mostrou ter extrema importância foi a qualidade das amostras, nomeadamente, se os soros apresentam hemólise. Na verdade, quando o soro estava hemolisado, os *dots* mostravam, invariavelmente, um sinal de grande marcação, como se a quantidade de sHER-2 fosse muito elevada (figura 25), o que pode induzir em falsos positivos. Assim, todas as amostras hemolisadas foram descartadas.

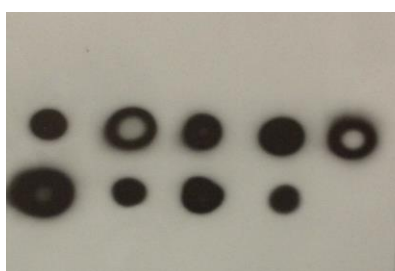


Figura 25 – Ensaio de *Dot Blot* com soros hemolisados.

Reprodutibilidade: uma característica que uma técnica em fase de otimização deve apresentar é reprodutibilidade dos seus resultados (intra-amostra, inter-amostra, independente da posição na membrana). Esta técnica mostrou uma boa reprodutibilidade dos resultados (figura 26), assegurando que as eventuais alterações entre ensaio são apenas dependentes da quantidade de sHER-2 na amostra e de nenhum outro fator.

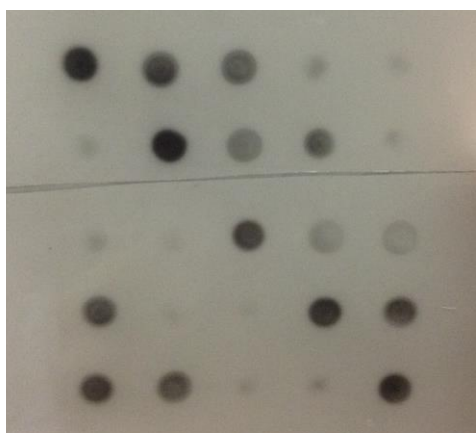


Figura 26 – Neste *Dot Blot*, foram primeiro pipetados cinco soros diferentes (linha superior); Depois, em cada linha subsequente, deslocou-se a posição das amostras em um lugar para a direita, em relação à posição que tinham na linha anterior. Assim, pode-se constatar que a posição da membrana em que a amostra é pipetada não altera, significativamente, a intensidade do sinal obtido.

Semi-quantificação do sHER-2: a técnica de *Dot Blot* é uma técnica semi-quantitativa, por possibilitar a comparação entre a intensidade do sinal dos vários soros testados (cada *dot* corresponde ao soro de uma gata com TM) com *dots* de diluições padrão, que foram obtidas a partir de diluições seriadas de uma solução de DEC-HER-2 recombinante humana, com concentrações conhecidas (figura 27). Desta forma, é possível comparar o sinal obtido para cada amostra, ou seja, cada *dot*, que se obtém no ensaio com os *dots* das diluições padrão e assim, aferirmos a concentração “aproximada” do sHER-2 das nossas amostras.



Figura 27 – *Dot Blot* das amostras de diluições padrão com concentrações conhecidas do DEC-HER-2 humano. Da esquerda para a direita, a intensidade de sinal em cada *dot* corresponde, respetivamente, a uma concentração de DEC-HER-2 de 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 e 5 ng/ml.

2.2. Doseamento do sHER-2 em Gatas com TMF HER-2+

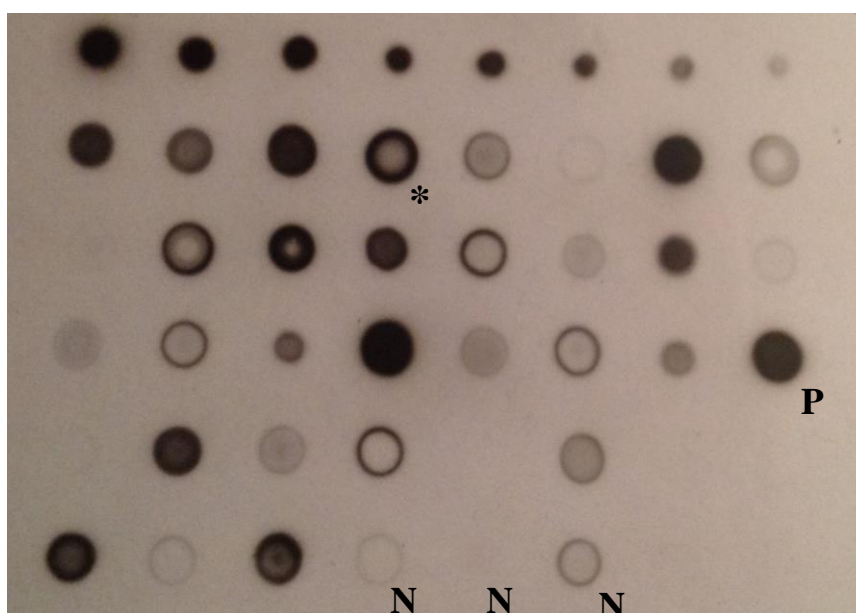


Figura 28 – Figura ilustrativa de um ensaio final de *Dot Blot*. A linha superior corresponde às amostras de concentrações decrescentes e *padrão* do sHER-2. Os vários *dots* nas linhas abaixo correspondem, cada um deles, a uma amostra de soro de gata com adenocarcinoma mamário, cujo valor do sHER-2 foi atribuído comparando cada um desses *dots* com os *dots* das concentrações padrão. Adicionalmente, tem também controlos, nomeadamente os *dots* assinalados com N (são os controlos negativos - amostras de soro de animais saudáveis) e com P (linha celular SKBR3, que se sabe sobreexpressar HER-2 e, portanto, serve como controlo positivo). Estes dois tipos de controlo servem para validar o ensaio.

De referir que quando os níveis do sHER-2 são muito elevados, pode haver inversão do sinal, causando um *dot* com aspeto semelhante a uma auréola (*).

Importante no contexto da determinação do sHER-2 é verificar se os controlos negativos, isto é, os soros provenientes de animais saudáveis, não têm níveis do sHER-2 elevados. Foi feito um ensaio com os 20 soros negativos, e destes, houve cinco soros controlo com níveis

elevados do sHER-2 (25%) quando se admitia o *cutoff* de 10 ng/ml, e dois soros controle com níveis elevados do sHER-2 (10%), utilizando o *cutoff* de 15 ng/ml.

Das 42 gatas com adenocarcinoma mamário que entraram no estudo, 15 tinham metástases nos linfonodos (TMM), 20 apresentavam apenas lesão primária e em 7 casos não havia informação sobre o estado invasivo do tumor.

A cada um desses animais, a que corresponde um *dot*, foi atribuído um valor à concentração do sHER-2, após comparação com a intensidade dos *dots* das concentrações padrão. O *Dot Blot* permitiu detetar valores do sHER-2 inferiores a 5 ng/ml e superiores a 75 ng/ml. Os resultados foram: 16 casos com valores de sHER-2 menores ou iguais a 5 ng/ml, 10 gatas com valores próximos de 10 ng/ml, 6 gatas com 15 ng/ml, 4 soros com sHER-2 na concentração de 20 ng/ml, 1 soro com 25 ng/ml, 3 gatas com 50 ng/ml e 2 gatas com 75 ng/ml.

Inicialmente, foram tomados em linha de conta, para efeitos de análise estatística, 42 casos sem discriminar a existência de metástases nos linfonodos. Destes, 48% dos tumores tinham sido classificados como HER-2+ por IHQ (classificações 2+ e 3+).

Em seguida, foram avaliados 4 *cutoffs* de positividade para HER-2 (10 ng/ml, 15, 20 e 37 ng/ml), afim de ser escolhido o que apresentava maior concordância simples com a técnica de IHQ.

Para analisar se a concordância entre os valores obtidos na IHQ e os valores obtidos no *Dot Blot* eram estatisticamente significativos, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Kendall (T), adequado para aferir a concordância entre dois conjuntos de classes relativas a um conjunto de objetos ou experiências (neste caso entre dois testes de diagnóstico).

			Resultados IHQ			Concordância simples
			0/1+	2+	3+	
Cutoff de Dot Blot	10 ng/ml	Negativo	13	3	0	71%
		Positivo	9	10	3	
	15 ng/ml	Negativo	17	6	3	67%
		Positivo	5	7	4	
	20 ng/ml	Negativo	19	9	4	62%
		Positivo	3	4	3	
	37 ng/ml	Negativo	22	11	4	64%
		Positivo	0	2	3	

Tabela 1 – Tabela com os resultados obtidos, mostrando os valores concordantes e discordantes entre as técnicas de IHQ e de *Dot Blot*, usando a concordância simples.

Adicionalmente, foi também calculada uma medida de fiabilidade simples, de concordância simples entre duas classes, dividindo o número de classes concordantes (positivos ou negativos em ambas as técnicas) pelo número total de objetos classificados (Siegel & Castellan, 1988). Através do programa de análise estatística SPSS®, foram calculados o coeficiente de Kendall e a concordância simples.

Destes, os *cutoffs* com valores mais concordantes foram o de 10 e o de 15 ng/ml (tabela 1), e foram estes *cutoffs* que foram estudados em termos estatísticos.

Assim, usando o *cutoff* de 15 ng/ml, 38% dos 42 TM totais foram classificados como HER-2 positivos através da análise do sHER-2 (ou seja, tinham níveis do sHER-2 maiores ou iguais a 15 ng/ml) e 62% como negativo (níveis do sHER-2 menores que 15 ng/ml).

Apesar dos valores apresentarem uma concordância simples de 67%, o valor do coeficiente de Kendall não é estatisticamente significativo e é reduzido, sendo de 0,332¹².

É de salientar, contudo, o facto destes valores corresponderem à população total de adenocarcinomas mamários, sem discriminar a existência de metástases.

De seguida, fez-se uma subdivisão dos 42 TMF: 20 casos eram TMP (só tumor primário, sem metástases) e 15 eram de gatas com TMM (com metástases nos linfonodos). Nas 20 gatas com TMP, 45% mostraram valores aumentados do sHER-2 (maior ou igual a 15 ng/ml) e uma concordância simples de 65%, apesar do valor de Kendall continuar reduzido e estatisticamente não significativo (0,287).

No grupo das 15 gatas com TMM, 27% de casos apresentavam valores aumentados do sHER-2. A concordância simples para este grupo de animais foi 73% e o valor de Kendall 0,564, valor de correlação estatisticamente significativo (tabela 2). Em relação à IHQ, em TMM, o ensaio de *Dot Blot* com *cutoff* de 15 ng/ml mostrou uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 50%.

Utilizando o *cutoff* de 10 ng/ml, 62% dos 42 casos de TM totais foram classificados como positivos (maior ou igual a 10 ng/ml) e 38% foram classificados como negativos.

A concordância simples com este *cutoff* de 10 ng/ml foi de 71% e o valor de Kendall foi de 0,453, valores superiores aos obtidos no *cutoff* de 15 ng/ml, mas não estatisticamente significativos.

Realizando-se a subdivisão das gatas com TM, no grupo das 20 gatas com TMP, 70% tiveram valores aumentados do sHER-2, com uma concordância simples de 60% e valor de Kendall de 0,312, e portanto, reduzido (valor não significativo em termos estatísticos).

¹² Este coeficiente de Kendall está compreendido entre 0 e 1, sendo 0 ausência de concordância e 1 concordância perfeita.

No grupo das 15 gatas que apresentaram TMM, 53% dos casos apresentavam valores aumentados do sHER-2. Utilizando o *cutoff* de 10 ng/ml neste subgrupo das gatas com TMM, a concordância simples entre os resultados da IHQ e do *Dot Blot* foi de 87% e o coeficiente de correlação de Kendall foi de 0,732 (tabela 3), com valor de correlação estatisticamente significativo, mostrando uma boa correlação entre as duas técnicas, para os TMM.

Usando este *cutoff* de 10 ng/ml nos TMM, o *Dot Blot* mostrou uma especificidade de 85,7% e uma sensibilidade de 87,5% em relação à IHQ.

		IHQ	Dot Blot
Teste de correlação de Kendall	IHQ	Coeficiente de correlação	1,000
		Sig. (2-tailed)	0,732*
		N	15
	Dot Blot (10 ng/ml)	Coeficiente de correlação	0,732*
		Sig. (2-tailed)	1,000
		N	15

* Correlação é significativa ($p < 0,01$)

Tabela 2 – Tabela com a análise estatística de correlação de Kendall entre os resultados da IHQ e os resultados do *Dot Blot*, em TMM, com *cutoff* de 15 ng/ml.

		IHQ	Dot Blot
Teste de correlação de Kendall	IHQ	Coeficiente de correlação	1,000
		Sig. (2-tailed)	0,564*
		N	15
	Dot Blot (15 ng/ml)	Coeficiente de correlação	0,564*
		Sig. (2-tailed)	1,000
		N	15

* Correlação é significativa ($p < 0,05$)

Tabela 3 – Tabela com a análise estatística de correlação de Kendall entre os resultados da IHQ e os resultados do *Dot Blot*, em TMM, com *cutoff* de 10 ng/ml.

3) Discussão

Um dos objetivos deste estudo foi demonstrar, pela primeira vez, a existência do sHER-2 no soro de gatas com TM HER-2+, o que foi conseguido pela técnica de *Dot Blot*. Estas observações evidenciam a importância que este biomarcador tumoral (sHER-2) pode vir a ter na medicina felina, caso esteja correlacionado com o diagnóstico/prognóstico e condicione o tratamento, à semelhança do que acontece na Mulher.

Outro dos objetivos prendia-se em verificar a possibilidade da técnica de *Dot Blot* servir para determinar a concentração do sHER-2 no soro de gatas e se esta técnica mostraria resultados similares às técnicas já padronizadas e validadas para determinar o *status* do HER-2 na Mulher, como a IHQ. Nesse sentido, avaliou-se a concordância entre os resultados obtidos no *Dot Blot* e na IHQ.

Relativamente ao *cutoff* de 15 ng/ml, nos TM totais, houve 38% de TM com níveis aumentados do sHER-2, valor que se encontra de acordo com os valores da literatura relativa à Mulher, a qual aponta para uma média de 32% dos pacientes com TM com níveis elevados do sHER-2 (Lam *et al.*, 2012). De salientar que este *cutoff* (15 ng/ml) é o mais seguido nos vários estudos que contemplam a determinação do sHER-2 na Mulher (Lam *et al.*, 2012).

Para este *cutoff*, nos 42 TM, havia uma correlação simples moderada entre os resultados obtidos na IHQ e os obtidos pelo *Dot Blot* (67%), mas não estatisticamente significativos.

No entanto, o *cutoff* de 10 ng/ml foi o que apresentou resultados mais concordantes com a IHQ, ou seja, amostras que tenham sido classificadas com uma concentração de sHER-2 maior ou igual a 10 ng/ml apresentavam maior probabilidade de serem consideradas positivas para HER-2 através da IHQ. Em relação ao *cutoff* de 10 ng/ml, como referido anteriormente, houve 62% de TM positivos (com níveis maiores ou iguais a 10 ng/ml). Estes valores são díspares em relação aos valores reportados na literatura na Mulher (32%), havendo maior número de casos positivos do que com o *cutoff* de 15 ng/ml. Tal acontece porque sendo o *cutoff* menor que o de 15 ng/ml, há maior número de casos a serem classificados como tendo os níveis elevados do sHER-2. Mais uma vez, nos TM totais, os valores de correlação não foram estatisticamente significativos (0,453) e a concordância entre as duas técnicas foi moderada (71%), apesar dos valores obtidos terem sido superiores aos valores do *cutoff* de 15 ng/ml.

No entanto, a literatura publicada atribui, claramente, maior importância na determinação do sHER-2 a mulheres com TM metastáticos (Carney *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2011), uma vez que os valores de sHER-2 parecem ter maior probabilidade de estarem aumentados durante o

processo de metastização. Carney e colegas (2003) apontam valores positivos de sHER-2, em média, em 18,5% das pacientes com TMP e em 43% das mulheres com TMM. Noutra revisão bibliográfica (Tsé *et al.*, 2012), o valor do sHER-2 estava aumentado entre 9 e 22,9% dos TMP e entre 22 e 73% das pacientes com TMM.

Nesse sentido, os TM foram subgrupados em TMP (se só havia lesão na glândula mamária) e em TMM (com metástases nos linfonodos), para verificar como seria a correlação entre as duas técnicas, tendo em conta a existência ou não de metástases.

Em relação aos TMM, onde foi verificado uma correlação estatisticamente significativa e uma concordância elevada entre as duas técnicas, houve 27% e 53% de TM com níveis elevados do sHER-2, respetivamente, com *cutoff* de 15 ng/ml e de 10 ng/ml. Estes valores estavam de acordo com a literatura relativa ao estudo deste biomarcador sérico na Mulher, que aponta para níveis aumentados do sHER-2 em 22 a 73% das pacientes com TMM. Estes resultados concordantes nos TMM demonstram a importância do *shedding* do HER-2 e da existência de níveis elevados do sHER-2 no processo de metastização (Carney *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2012; Tsé *et al.*, 2012).

Quando foi analisada a concordância no subgrupo dos 20 TMP, houve níveis aumentados do sHER-2 em 45% e em 70% dos casos, respetivamente, com *cutoff* de 15 ng/ml e 10 ng/ml. Ambos os valores se encontram superiores aos consultados na literatura, que refere níveis aumentados do sHER-2 em 9 a 22,9% das mulheres com TMP (Tsé *et al.*, 2012). Adicionalmente, o valor de correlação de Kendall não foi estatisticamente significativo (0,287 e 0,312, respetivamente para o *cutoff* de 15 ng/ml e de 10 ng/ml), à semelhança dos valores obtidos nos 42 TM totais.

Uma das causas para a reduzida concordância estatística entre os dois métodos poderá residir no sistema de classificação utilizado na IHQ para a avaliação do *status* do HER-2. Alguma da discordância observada foi entre os TMF HER-2 positivos pela IHQ mas negativos no *Dot Blot*. De facto, com o *cutoff* de 15 ng/ml a maior parte dos casos de discordância encontram-se nesta situação (quer na totalidade dos TM, quer nos TMM), especialmente com os TM classificados como 2+ na IHQ. Ora, na Mulher, os TM classificados como 2+ na IHQ são considerados duvidosos e é feita a revalidação do *status* do HER-2 pela técnica de FISH, como sugerem as *guidelines* da ASCO (Wolff *et al.*, 2007), afim de determinar se ocorre ou não amplificação do gene HER-2. No entanto, na espécie felina e, ao contrário daquilo que acontece com a Mulher, onde a sobreexpressão do HER-2 está relacionada com a amplificação do gene, não se conhece o mecanismo responsável pela sobreexpressão do recetor. Na verdade, os únicos estudos publicado até à data que utilizaram a técnica de FISH para determinar se havia amplificação do gene HER-2 nos TMF classificados como HER-2+ por IHQ,

verificaram que não existia nenhum caso com amplificação (Soares *et al.*, 2013) ou então esta amplificação era rara (Ordás *et al.*, 2007).

Na Mulher, só 15-48% dos TM classificados como 2+ na IHQ é que têm amplificação do gene HER-2, logo, se a situação da Gata fosse semelhante à Mulher, nomeadamente em termos de amplificação génica, alguns destes TMF-HER-2 2+ poderiam ser, na verdade, falsos positivos, justificando a discordância entre as técnicas. No entanto, apesar de não haver amplificação génica, não se sabe se todos os TMF classificados como 2+ na IHQ (que são assumidos como sendo positivos para HER-2) têm, na verdade, sobreexpressão de HER-2, sendo necessários mais estudos para esclarecer este ponto.

Apesar das situações de discordância observadas entre os TMF-HER2+ por IHQ e negativos por *Dot Blot*, a situação inversa (tumores classificados como HER-2 negativos na IHQ e HER-2 positivos no *Dot Blot*) também ocorre e as respetivas justificações não devem ser desprezadas. Na verdade, com um *cutoff* de 10 ng/ml, a maior parte dos casos discordantes refere-se a esta situação, nos TM totais e nos 2 subgrupos considerados.

Tal situação pode dever-se à heterogeneidade intra-tumoral (Pallud *et al.*, 2005), podendo dar-se o caso de, num TMF HER-2+ ter sido selecionada para IHQ uma porção/área do tumor com menor expressão de HER-2, ocasionando um falso negativo na IHQ, apesar de poder haver níveis elevados de sHER-2 (positivos no *Dot Blot*).

O próprio sistema de classificação do HER-2 através da IHQ também pode promover esta discordância, uma vez que TM classificados na IHQ como sendo HER-2 negativos podem apresentar células tumorais que sobreexpressem HER-2 em quantidade suficiente que induza um aumento de sHER-2 detetável pelo *Dot Blot*, especialmente em situações de metastização e de recidiva (Lam *et al.*, 2012).

É também de referir que existem alterações capazes de aumentar os níveis do sHER-2 e assim originarem TMF falsos positivos por *Dot Blot*. Com efeito, entre 4 e 22% das mulheres saudáveis apresentam níveis aumentados de sHER-2 (Lam *et al.*, 2012). Assim, é possível que uma percentagem variável de gatas saudáveis ou com TM HER-2 negativos e, portanto, com um *status* do HER-2 negativo por IHQ, possam ter valores elevados de sHER-2, gerando sinal positivo no *Dot Blot*. Na verdade, quando se analisaram os soros controlos (de gatas saudáveis), houve 25% e 10% (utilizando o *cutoff* de 10 ng/ml e de 15 ng/ml, respetivamente) das 42 amostras que marcaram níveis elevados do sHER-2, o que se encontra de acordo com o intervalo descrito para a Mulher (4 a 22%, segundo Lam *et al.*, 2012).

Como foi referido anteriormente, os soros hemolisados foram eliminados do estudo, e podia dar-se o caso de serem, hipoteticamente, amostras que mostrassem concordância entre as duas técnicas, o que maximizaria esta medida estatística de correlação.

Por outro lado, o anticorpo primário utilizado tem influência nos resultados e dessa forma na avaliação da técnica de *Dot Blot* (Pallud *et al.*, 2005).

Outra razão que ajuda a justificar a discordância observada tem que ver com o facto do sHER-2 ser mais fiável em pacientes com TMM (Lam *et al.*, 2012), uma vez que o *shedding* do recetor ocorre com maior frequência aquando de episódios de recidiva e de metastização (Carney *et al.*, 2003), ou até mesmo na formação de micrometástases ou metástases ocultas (Ludovini *et al.*, 2008).

De facto, esta tendência parece manter-se na nossa amostragem felina, onde a concordância entre a IHQ e o *Dot Blot* nos 15 TM com metástases nos linfonodos é superior (coeficiente de correlação de Kendall de 0,564 com *cutoff* de 15 ng/ml, ou de 0,732 com *cutoff* de 10 ng/ml), em relação ao subgrupo de gatas com TM não metastáticos, e é o único grupo onde houve correlação estatística.

Foram também determinadas a sensibilidade e especificidade da técnica de Dot Blot em relação à IHQ, nos TMM, com os 2 *cutoffs*: com 15 ng/ml, a sensibilidade foi de 50%, mas tinha uma especificidade de 100%, o que implicava que nenhum TM era classificado como positivo para *Dot Blot* que não tivesse sido classificado como positivo para a IHQ, nos TMM; com 10 ng/ml, a especificidade foi ligeiramente mais baixa (85,7%), mas a sensibilidade aumentou muito (87,5%), uma vez que ao diminuir o *cutoff* há maior número de positivos detetados, diminuindo a probabilidade dos positivos não serem classificados como tal. Contudo, aumenta a possibilidade de falsos positivos.

Tsé e colegas (2005) afirmam que há uma sensibilidade de 90% e 83% de especificidade das técnicas que quantificam o sHER-2 em relação à IHQ, valores bastante semelhantes aos obtidos no nosso estudo pela técnica de *Dot Blot*, nos TMM, quando aplicado um *cutoff* de 10 ng/ml.

No único estudo que até à data utilizou esta técnica de *Dot Blot* para determinar o sHER-2 na Mulher, a especificidade da técnica em relação à IHQ foi de 73% e a sensibilidade de 61% (Tan *et al.*, 2011).

Importa, contudo, referir que a otimização realizada na técnica de *Dot Blot* no decorrer deste estudo poderá ser ainda melhorada, de forma a aumentar a precisão e a exatidão do *Dot Blot* e, assim, contribuir para a sua validação e robustez.

4) Conclusões

Geneticamente, os TM são um tipo de neoplasia heterogênea e complexa, com inúmeros fatores a intervir na sua etiologia, patogenia, desenlace clínico e na tipologia terapêutica a instituir. Se, em Medicina Humana, a investigação tem permitido desenvolver novas formas de diagnóstico e terapêuticas cada vez mais eficazes, em Medicina Veterinária, os progressos têm ficado muito aquém do que a classe profissional médico-veterinária desejaria.

O estudo de otimização aqui apresentado vem ajudar a dar mais um passo no avanço da Medicina Veterinária, diminuindo a desigualdade entre esta e a sua congénere humana.

De facto, dos vários subtipos moleculares de TM conhecidos, um pela sua especial relevância, é o subtipo HER-2+. É sabido da sua importância em Medicina Humana, devido ao seu valor prognóstico e de predição à resposta terapêutica.

Contudo, falta muita informação no que concerne ao valor do *status* do HER-2 nos pequenos animais, podendo o seu conhecimento ajudar a desenvolver formas terapêuticas dirigidas especialmente contra a proteína HER-2 (como existe o trastuzumab e o lapatinib, no caso da Mulher).

Nesse sentido, a adaptação de uma técnica que permita a determinação do *status* o HER-2, nomeadamente do sHER-2, de modo rápido, barato e eficaz é uma mais-valia que não deve ser, de maneira nenhuma, descurada em Medicina Veterinária.

Os nossos resultados demonstraram que o *Dot Blot* é, pois, uma técnica que mostra um bom grau de concordância com a IHQ, em particular nos TMF com metástases. É uma técnica bastante simples de realizar, com resultados em 24 horas, barata (utilização de pouca quantidade de anticorpos e reagentes) e não precisa de equipamento especializado.

Como outra qualquer técnica em fase otimização, carece de algum aperfeiçoamento adicional, para melhor validação das suas qualidades.

Por último, a ambição destes ensaios de otimização pretendem em último grau, ser uma ajuda na justificação do desenvolvimento/aplicação de formas terapêuticas anti-HER-2, nomeadamente, anticorpos anti-HER-2 ou inibidores de atividade TQ na espécie felina.

5) Bibliografia

- Abcam (2012). *Dot Blot Protocol*. Acedido em Setembro 15, 2012, disponível em <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/dot%20blot%20protocol.pdf>.
- Ailles, L.E. & Weissman, I.L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (5):460-6.
- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 27; 232 (4758): 1644-6.
- Akiyama, T., Saito, T., Ogawara, H., Toyoshima, K., & Yamamoto, T. (1988). Tumor promoter and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the c-erbB-2 gene product in MKN-7 human adenocarcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 8 (3), 1019–26.
- Akkoc, A., Inan, S. & Sonmez, G. (2012) Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. *Biotechnic & Histochemistry*, 87 (4):312-9.
- Ali, S. M., Leitzel, K., Chinchilli, V. M., Engle, L., Demers, L., Harvey, H. A. & Lipton, A. (2002). Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Chemistry*, 48 (8), 1314–20.
- Ali, S. M., Carney, W. P., Esteva, F. J., Fornier, M., Harris, L., Köstler, W. J. & Lipton, A. (2008). Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*, 113 (6), 1294–301.
- Andersen, T.I., Paus, E., Nesland, J.M., McKenzie, S.J. & Børresen AL. (1995). Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. Relationship to ERBB2 gene amplification and c-erbB-2 protein overexpression in tumour. *Acta Oncologica*, 34: 499–504.
- Andersson, M., Rönnmark, J., Areström, I., Nygren, P.A. & Ahlborg, N. (2003). Inclusion of a non-immunoglobulin binding protein in two-site ELISA for quantification of human serum proteins without interference by heterophilic serum antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 283 (1-2): 225-34.
- Anido, J., Scaltriti, M., Bech Serra, J. J., Santiago Josef, B., Todo, F. R., Baselga, J. & Arribas, J. (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 25 (13), 3234–44.
- Argyle, D.J. & Khanna, C. (2007). Tumor Biology and Metastasis. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4th ed.). (pp. 40-62). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Arribas, J., Baselga, J., Pedersen, K. & Parra-Palau, J. L. (2011). p95HER2 and breast cancer. *Cancer Research*, 71 (5), 1515–9.

- Asgeirsson, K. S., Agrawal, A., Allen, C., Hitch, A., Ellis, I. O., Chapman, C. & Robertson, J. F. R. (2007). Serum epidermal growth factor receptor and HER2 expression in primary and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 9 (6), R75.
- Atalay, G., Cardoso, F., Awada, A., & Piccart, M.J. (2003). Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Annals of Oncology*, 14 (9), 1346–1363.
- ATCC (2013). *SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™)*. Acedido em Agosto 11, 2013, disponível em <http://www.lgcstandards-atcc.org/>.
- Baba, A.I. (2007). Mammary Gland Tumors. In A.I. Baba & C. Câtoi. *Comparative Oncology*, Capítulo 11. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy
- Bánkfalvi, A., Tory, K., Kemper, M., Breukelmann, D., Cubick, C., Poremba, C., Füzesi, L., Lellè, R.J. & Böcker, W. (2000). Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2, p21 and bcl-2 in breast carcinoma. *Pathology, Research and Practice*, 196 (7): 489-501.
- Baptista, C. S. (2011). *Cat mammary tumours: genomic and functional characterization*. Ph.D. Thesis. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.
- Bartkova, J., Lukas, J., Müller, H., Lützhøft, D., Strauss, M. & Bartek, J. (1994). Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *The International Journal of Cancer*, 1; 57 (3): 353-61.
- Baselga, J., Perez, E.A., Pienkowski, T. & Bell, R. (2006). Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*, 11 Suppl 1:4-12.
- Batra, J.K., Kasprzyk, P.G, Bird, R.E., Pastan, I. & King, C.R. (1992). Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1; 89 (13): 5867–5871.
- Bazley, L.A. & Gullick, W. J. (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-related Cancer*, 12 Suppl 1, S17–27.
- Bendell, J.C., Domchek, S.M. & Burstein, H.J. (2003). Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 97, 2972–2977.
- Bertos, N. R. & Park, M. (2011). One term , many entities. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (10), 3789–3796.
- Bio-Rad. (2012). *Protein Blotting Guide*. Acedido em Setembro 27, 2012, disponível em http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf.
- Bio-rad (2013). *Bio-Dot® and Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus*. Acedido em Agosto 7, 2012, disponível em <http://www.bio-rad.com/en-us/product/bio-dot-bio-dot-sf-microfiltration-apparatus>.

- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 17; 411 (6835): 355-65.
- Borrego, J.F., Cartagena, J.C. & Engel, J. (2009). Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Veterinary and Comparative Oncology*, 7 (4):213-21.
- Bouyain, S., Longo, P.A., Li, S., Ferguson, K.M., Leahy, D.J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (42): 15024–15029
- Bramwell, V.H., Doig, G.S., Tuck, A.B., Wilson, S.M., Tonkin, K.S., Tomiak, A., Perera, F., Vandenberg, T.A. & Chambers, A.F. (2009). Changes over time of extracellular domain of HER2 (ECD/HER2) serum levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114 (3): 503-11.
- Brearley, M.J. (1989). Mammary gland tumours in the dog. In Practice, 11, 248-253.
- Brown, C.L., Meise, K.S., Plowman, G.D., Coffey, R.J. & Dempsey, P.J. (1998). Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin recursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form. *Journal of Biological Chemistry*, 273 17258–17268.
- Brunetti, B., Asproni, P., Beha, G., Muscatello, L. V., Millanta, F., Poli, A. & Sarli, G. (2012). Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *Journal of Comparative Pathology*, 148 (2-3), 206–13.
- Burgess, A. W., Cho, H., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P. J., Leahy, D. J. & Parade, R. (2003). An Open-and-Shut Case ? Recent Insights into the Activation of EGF / ErbB Receptors CSIRO Health Science and Nutrition. *Molecular Cell*, 12, 541–552.
- Burns, D.M., He, C., Li, Y., Scherle, P., Liu, X., Marando, C.A., Covington, M.B., Yang, G., Pan, M., Turner, S., Fridman, J.S., Hollis, G., Vaddi, K., Yeleswaram, S., Newton, R., Friedman, S., Metcalf, B. & Yao, W. (2008). Conversion of an MMP-potent scaffold to an MMP-selective HER-2 sheddase inhibitor via scaffold hybridization and subtle P1' permutations. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 15; 18 (2): 560-4.
- Burrai, G. P., Mohammed, S. I., Miller, M. a, Marras, V., Pirino, S., Addis, M. F., ... Antuofermo, E. (2010). Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer*, 10, 156.
- Calafat, J., Weijer, K. & Daams, H. (1977). Feline malignant mammary tumors. III. Presence of C-particles and intracisternal A-particles and their relationship with feline leukemia virus antigens and RD-114 virus antigens. *International Journal of Cancer*, 15; 20 (5):759-67.
- Capizzi, E., Gruppioni, E., Grigioni, A.D., Gabusi, E., Grassigli, A., Grigioni, W.F. & Fiorentino, M. (2008). Real time RT-PCR approach for the evaluation of ERBB2 overexpression in breast cancer archival samples: a comparative study with FISH, SISH, and immunohistochemistry. *Diagnostic Molecular Pathology*, 17 (4):220-6.

- Carney, W. P., Neumann, R., Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S. & Price, C. P. (2003). Potential Clinical Utility of Serum HER-2 / neu Oncoprotein Concentrations in Patients with Breast Cancer. *Clinical Chemistry*, 49 (10), 1579–1598.
- Carney, W. P., Neumann, R., Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S. & Price, C. P. (2004). Monitoring the Circulating Levels of the HER2/neu Oncoprotein in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 5 (2), 105–116.
- Carpenter, G., King, L. & Cohen, S. (1978) Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276, 409–410.
- Carraway, K.L. & Cantley, L.C. (1994). A *Neu* Acquaintance for ErbB3 and ErbB4 : A Role for Receptor Heterodimerization in Growth Signaling Minireview. *Cell*, 78, 5–8.
- Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., & Caramelli, M. (1998). Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 119 (3), 263–75.
- Cell Signaling Technology (2013). *Secondary Antibodies*. Acedido em Agosto 10, 2013, disponível em http://www.cellsignal.com/catalog/type/secondary_antibody.html.
- Ceresa, B.P. & Schmid, S.L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis *Current Opinion in Cell Biology*, 12 (2): 204-10.
- Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14 (5):1368–1376.
- Cho, H., Mason, K., Ramyar, K. X. & Stanley, A. M. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421 (February).
- Christianson, T. A., Doherty, J. K., Lin, Y. J., Ramsey, E. E., Holmes, R., Keenan, E. J. & Clinton, G. M. (1998). NH2-terminally Truncated HER-2/neu Protein: Relationship with Shedding of the Extracellular Domain and with Prognostic Factors in Breast Cancer. *Cancer Research*, 58, 5123–5129.
- Citri, A., Kochupurakkal, B.S. & Yarden, Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research*, 284 (1), 54–65
- Citri, A., Gan, J., Mosesson, Y., Vereb, G., Szollosi, J. & Yarden, Y. (2004). Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 5 (12):1165-70.
- Colombo, P., Milanezi, F., Weigelt, B., & Reis-filho, J. S. (2011). Microarrays in the 2010s : the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification , prognostication and prediction. *Breast Cancer Research*, 13 (212).
- Colomer, R., Montero, S., & Lluch, A. (2000). Circulating HER2 Extracellular Domain and Resistance to Chemotherapy in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 6, 2356–2362.

- Costa, M.M. (2010). *Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de Tumores Mamários na cadela e na gata*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A. & McGrath, J. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230: 1132-9.
- Cunningham, J. G. (2002). Textbook of veterinary physiology (3rd ed.). (pp. 417-431). W.B. Saunders Inc.
- de las Mulas, J.M., van Niel, M., Millán, Y., Blankenstein, M.A., van Mil, F. & Misdorp, W. (2000). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18 (1):111-25.
- de las Mulas, J.M., van Niel, M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M.A., van Mil, F. & Misdorp, W. (2002) Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72 (2):153-61.
- De Placido, S., De Laurentiis, M., Carlomagno, C., Gallo, C., Perrone, F., Pepe, S., Ruggiero, A., Marinelli, A., Pagliarulo, C., Panico, L., Pettinato, G., Petrella, G. & Bianco, A.R. (2003). Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9 (3), 1039-46
- de Ronde, J.J., Hannemann, J., Halfwerk, H., Mulder, L., Straver, M.E., Vrancken, P.M.J., Wesseling, J., van de Vijver, M., Wessels, L.F., Rodenhuis, S. (2010). Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119 (1):119-26.
- Dellman, H. & Eurell, J. A. C. (1998). Textbook of Veterinary Histology (5th ed.) New York: John Wiley & Sons.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P. & Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 1;13(15 Pt 1):4429-34.
- Derenzini, M., Trerè, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V. & Chieco, P. (2000). Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of Pathology*, 191 (2):181-6.
- Desmedt, C., Sperinde, J., Piette, F., Huang, W., Jin, X., Tan, Y., Durbecq, V., Larsimont, D., Giuliani, R., Chappey, C., Buyse, M., Winslow, J., Piccart, M., Sotiriou, C., Petropoulos, C. & Bates, M. (2009). Quantitation of HER2 expression or HER2:HER2 dimers and differential survival in a cohort of metastatic breast cancer patients carefully selected for trastuzumab treatment primarily by FISH. *Diagnostic Molecular Pathology*, 18 (1): 22-9.
- Dias-Pereira, P. & Gärtner, F. (2003). Expression of E-cadherin in normal, hyperplastic and neoplastic feline mammary tissue. *The Veterinary Record*, 6; 153 (10): 297-302

- Dias Pereira, P., Carvalheira, J. & Gartner, F. (2004). Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue – An immunohistochemical study. *The Veterinary Journal*, 168, 180–185.
- Dietel, M., Ellis, I.O., Höfler, H., Kreipe, H., Moch, H., Dankof, A., Kölbl, K. & Kristiansen, G. (2007). Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Archiv*, 451 (1): 19-25.
- Disis, M.L., Gralow, J.R., Bernhard, H., Hand, S.L., Rubin, W.D. & Cheever, M.A. (1996). Peptide-based, but not whole protein, vaccines elicit immunity to HER-2/neu, oncogenic self-protein. *Journal of Immunology*, 156 (9): 3151-8.
- Dnistrian, A.M., Schwartz, M.K. & Schwartz, D.C. (2003). Significance of serum HER-2/neu oncoprotein, CA 15-3 and CEA in the clinical evaluation of metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 25, 215- 220.
- Doherty, J.K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J.P., & Clinton, G.M. (1999). The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (19), 10869–74.
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. (2009). Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clinical cancer research*, 15 (4), 1140–4.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. (2010). Textbook of veterinary anatomy (4th ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Eccles, S. A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International Journal of Developmental Biology*, 44 (November), 685–696.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29: 258-89.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S. & Werb, Z. (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 18: 884–901.
- Ellenport, C.R. (1986). Aparelho Urogenital do carnívoro. In R. Getty, Anatomia dos Animais Domésticos – Volume 2 (5ª edição). (pp. 1492-1493). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
- Enrioni, C.L. & Reforzo-Membrives, J. (1984). Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women: a review. *Gynecologic Oncology*, 17 (1): 1-21.
- Erhart & Power (2007). The Pathology of Neoplasia. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), Small animal clinical oncology (4th ed.). (pp.54-67). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Esteva, F.J., Valero, V., Booser, D., Guerra, L.T., Murray, J.L., Pusztai, L., Cristofanilli, M., Arun, B., Esmaili, B., Fritsche, H.A., Sneige, N., Smith, T.L. & Hortobagyi, G.N.

- (2002). Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1; 20 (7): 1800-8.
- Esteva, F. J., Cheli, C. D., Fritsche, H., Fornier, M., Slamon, D., Thiel, R. P. & Ghani, F. (2005). Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Cancer Research*, 7 (4), 436–43.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., Duss, S., Nicoulaz, A.L., Briskin, C., Fiche, M., Delorenzi, M. & Iggo, R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 24:4660-4671.
- Fehm, T., Maimonis, P., Weitz, S., Teramoto, Y., Katalinic, A. & Jäger, W. (1997). Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 43 (1): 87-95.
- Fehm, T., Gebauer, G. & Jäger, W. (2002). Clinical utility of serial serum c-erbB-2 determinations in the follow-up of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 75 (2): 97-106.
- Fergenbaum, J.H., Garcia-Closas, M., Hewitt, S.M., Lissowska, J., Sakoda, L.C. & Sherman, M.E. (2004). Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13 (4): 667-72.
- Finn, R.S., Gagnon, R., Di Leo, A., Press, M.F., Arbushites, M. & Koehler, M. (2009). Prognostic and predictive value of HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer treated with lapatinib and paclitaxel in a randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 20; 27 (33):5552-8.
- Fleishman, S. J., Schlessinger, J. & Ben-Tal, N. (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (25), 15937–40.
- Fontana, X., Ferrari, P., Namer, M., Peysson, R., Salanon, C., Bussiere, F. (1994). C-erb-B2 gene amplification and serum level of c-erb-B2 oncoprotein at primary breast cancer diagnosis. *Anticancer Research*, 14 (5B): 2099-104.
- Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, *et al* Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004;5:317-328.
- Gancberg, D., Di Leo, A., Cardoso, F., Rouas, G., Pedrocchi, M., Paesmans, M. & Larsimont, D. (2002). Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Annals of Oncology*, 13 (7), 1036 – 1043.
- Garcia-Caballero, T., Grabau, D., Green, A.R., Gregory, J., Schad, A., Kohlwes, E., Ellis, I.O., Watts, S. & Mollerup, J. (2010). Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic *in situ* hybridization is comparable to fluorescence *in situ* hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology*, 13 (4): 472–480.

- García-Rivello, H., Taranda, J., Said, M., Cabeza-Meckert, P., Vila-Petroff, M., Scaglione, J. & Hertig, C. M. (2005). Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle. *American Journal of Physiology*, 289 (3), H1153–60.
- Garoufali, A., Kyriakou, F., Kountourakis, P., Yioti, I., Malliou, S., Nikaki, A., Kardara, E., Frangos, I., Koumna, S., Baziotis, N., Scorilas, A. & Ardavanis, A. (2008). Extracellular domain of HER2: a useful marker for the initial workup and follow-up of HER2-positive breast cancer. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 13 (3): 409-13.
- Garratt, A.N., Ozcelik, C. & Birchmeier, C. (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(2): 80-6.
- Genbank (2013). *ERBB2 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)*. Acedido em Julho 27, 2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=her-2%20felis%20catus>.
- Geyer, F.C., Marchio, C. & Reis-Filho, J.S. (2009). The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*, 41 (1):77-88.
- Giménez, F., Hecht, S., Craig, L. E., & Legendre, A. M. (2010). Early detection, aggressive therapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 214–224.
- Glas, A.M., Floore, A., Delahaye, L.J., Witteveen, A.T., Pover, R.C., Bakx, N., Lahti-Domenici, J.S., Bruinsma, T.J., Warmoes, M.O., Bernards, R., Wessels, L.F., Van't Veer, L.J. (2006). Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*, 30; 7:278.
- Goldenberg, M.M. (1999). Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clinical Therapeutics*, 21 (2): 309-18
- Gown, A. M. (2009). Molecular vs. Immunohistochemical classification of breast cancer. *Breast Cancer*, (2), 28–30.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. & Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 16 (7), 1647–55.
- Gusterson, B. a, Gullick, W. J., Venter, D. J., Powles, T. J., Elliott, C., Ashley, S. & Harrison, S. (1988). Immunohistochemical localization of c-erbB-2 in human breast carcinomas. *Molecular and cellular probes*, 1(4), 383–91. Hayden, D. W., & Nielsen, S. W. (1971). Feline mammary tumours. *The Journal of Small Animal Practice*, 12 (12), 687–98.
- Gutierrez, S., Rapiejko, P., Emerick, M., Mabuchi, M., Park, J., Lovejoy, A. & Sharma, A. (2008). Novel Method for Fast Immunodetection Using Vacuum Filtration. In *Experimental Biology*.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D. & Muller, W.J. (1996). Activated neu induces rapid tumor progression. *Journal of Biological Chemistry*, 29; 271 (13): 7673-8.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S. & Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American

- Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28 (16), 2784–95.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*, 100, 57–70.
- Hanna, W. M., & Kwok, K. (2006). Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19 (4), 481–7.
- Hansen, K. & Khanna, C. (2004). Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *European Journal of Cancer*, 40 (6): 858-80.
- Harari, D. & Yarden, Y. (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19 (53), 6102–14.
- Harris, B. L. N., Liotcheva, V., Broadwater, G., Ramirez, M. J., Maimonis, P., Anderson, S. & Bentley, R. C. (2001). Comparison of Methods of Measuring HER-2 in Metastatic Breast Cancer Patients Treated With High-Dose Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 19 (6), 1698–1706.
- Harris, L.N., Liotcheva, V., Broadwater, G., Ramirez, M.J., Maimonis, P., Anderson, S., Everett, T., Harpole, D., Moore, M.B., Berry, D.A., Rizzeri, D., Vredenburgh, J.J. & Bentley, R.C. (2001). Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 15; 19 (6):1698-706.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S. & Bast, R. C. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33), 5287–312.
- Hayashi, N., Nakamura, S., Tokuda, Y., Yagata, H., Yoshida, A., Ota, H., ... Ueno, N. T. (2012). Serum HER2 levels determined by two methods in patients with metastatic breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 17 (1), 55–62.
- Hayes, H.M.J., Milne, K.L. & Mandell, C.P. (1981). Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Veterinary Record*, 30; 108 (22):476-9.
- Hayes, A.A. & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America*, 15, 513-520.
- Hayes, D. F., Yamauchi, H., Broadwater, G., Cirrincione, C. T., Rodrigue, S. P., Berry, D. A. & Henderson, I. C. (2001). Circulating HER-2 / erbB-2 / c-neu (HER-2) Extracellular Domain as a Prognostic Factor in Patients with Metastatic Breast Cancer : Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clinical Cancer Research*, 7 (September), 2703–2711.
- Hermann, P.C., Bhaskar, S., Cioffi, M. & Heeschen, C. (2010). Cancer stem cells in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 20 (2):77-84.
- Honrado, E., Benítez, J., & Palacios, J. (2006). Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59 (1), 27–39.

- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz, O.A., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernard, P.S. & Perou, C.M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7:96.
- Hughes, K., & Dobson, J. M. (2012). Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Veterinary Journal*, 194 (1), 19–26.
- Ismail, A.A. (2005). A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clinical Chemistry*, 51 (1), 25–6.
- Jacobs, T. W., Gown, a M., Yaziji, H., Barnes, M. J. & Schnitt, S. J. (1999). Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17 (7), 1974–82.
- James, R., Thriveni, K., Ramaswamy, G., Krishnamoorthy, L., Mukherjee, G., Vijayalaxmi Deshmane, P. P. & Bapsy, P. P. (2008). Evaluation of immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay for HER-2/neu expression in breast carcinoma. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23 (4), 345–51.
- Järvinen, T.A. & Liu, E.T. (2003). HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78 (3), 299-311
- Jeglum, K.A., de Guzman, E. & Young, K.M. (1985). Chemotherapy for advanced mammary adenocarcinoma in 14 cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187:157-160.
- Jimenez, R. E., Wallis, T., Tabaszka, P. & Visscher, D. W. (2000). Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Modern Pathology*, 13 (1), 37–45.
- Jones, F. E., Welte, T., Fu, X. Y., & Stern, D. F. (1999). ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *The Journal of Cell Biology*, 147 (1), 77–88.
- Jones, F.E. & Stern, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene*. 10; 18 (23):3481-90.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). Histologia básica (10th ed.). (pp.449-452). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L. C., Smith, H. S. & Waldman, F. M. (1992). ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (12), 5321–5.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (6), 1420-1428.

- Kandl, H., Seymour, L. & Bezwoda, W. R. (1994). Soluble c-erbB-2 fragment in serum correlates with disease stage and predicts for shortened survival in patients with early-stage and advanced breast cancer. *British Journal of Cancer*, 70 (4), 739–42.
- Kath, R., Höffken, K., Otte, C., Metz, K., Scheulen, M. E., Hülkamp, F. & Seeber, S. (1993). The neu-oncogene product in serum and tissue of patients with breast carcinoma. *Annals of Oncology*, 4: 585–590.
- Keen, J. C., & Davidson, N. E. (2003). The biology of breast carcinoma. *American Cancer Society*, 97 (3 Suppl), 825–33.
- Khanna, C. & Paoloni, M. (2007). Molecular Diagnostics. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4th ed.). (pp.134-146). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- King, C.R., Kraus, M.H., Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 6; 229 (4717): 974-6.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., Higashiyama, S. (2004). Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321:1045–1049.
- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N. E., Andrews, G. C., Sela, M. & Yarden, Y. (1999). The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (9), 4995–5000.
- Klee, G. G. (2000). Human anti-mousa antibodies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124 (June), 921-923.
- Koletsa, T. & Kostopoulos, I. (2008). A Splice Variant of HER2 Corresponding to Herstatin Is Expressed in the Noncancerous Breast and in Breast Carcinomas. *Neoplasia*, 10 (7), 687–696.
- Kong, S.-Y., Kang, J. H., Kwon, Y., Kang, H.-S., Chung, K.-W., Kang, S. H. & Lee, E. S. (2006). Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 59 (4), 373–6.
- Köning, H. E. & Liebich, H. (2004). *Veterinary anatomy of domestic mammals* (4th ed.), Schattauer.
- Kontani, K., Kuroda, N., Hashimoto, S., Murazawa, C., Norimura, S., Tanaka, H., Ohtani, M., Fujiwara-Honjo, N., Kushida, Y., Date, M., Haba, R., Houchi, H., Yamauchi, A. & Yokomise, H. (2013). Clinical usefulness of human epidermal growth factor receptor-2 extracellular domain as a biomarker for monitoring cancer status and predicting the therapeutic efficacy in breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 14 (1): 20-8.
- Krainer, M., Brodowicz, T., Zeillinger, R., Wiltschke, C., Scholten, C., Seifert, M., Kubista, E. & Zielinski, C.C. (1997). Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. *Oncology*, 54 (6): 475-81. Lin, Y.Z. & Clinton, G.M. (1991). A soluble protein related to the HER-2 proto-oncogene product is released from human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 6 (4): 639-43.

- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. & Aaronson, S.A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (23), 9193–7.
- Kricka, L.J. (1999). Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry*, 45 (7): 942-56.
- Kuvaja, P., Würtz, S.Ø., Talvensaaari-Mattila, A., Brünner, N., Pääkkö, P. & Turpeenniemi-Hujanen, T. (2007). High serum TIMP-1 correlates with poor prognosis in breast carcinoma - a validation study. *Cancer Biomarkers*, 3 (6): 293-300
- Kwong, K.Y. & Hung, M.C. (1998) A novel splice variant of HER2 with increased transformation activity. *Molecular Carcinogenesis*, 23, 62–68.
- Lam, L., McAndrew, N., Yee, M., Fu, T., Tchou, J. C., & Zhang, H. (2012). Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826 (1), 199–208.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4th ed.). (pp. 619-634). Philadelphia: Saunders Elsevier
- Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D., & Schlessinger, J. (1989). Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 8 (2), 421–7.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C. & Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*, 378 (6555): 394-8.
- Lee, R.J., Albanese, C., Fu, M., D'Amico, M., Lin, B., Watanabe, G., Haines, G.K. 3rd, Siegel, P.M., Hung, M.C., Yarden, Y., Horowitz, J.M., Muller, W.J. & Pestell, R.G. (2000). Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (2): 672-83.
- Leitzel, K., Teramoto, Y., Konrad, K., Chinchilli, V. M., Volas, G., Grossberg, H. & Lipton, A. (1995). Elevated Serum c-erbB-2 Antigen Levels and Decreased Response to Hormone Therapy of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 13 (5), 1129–1135.
- Lennon, S., Barton, C., Banken, L., Gianni, L., Marty, M., Baselga, J. & Leyland-Jones, B. (2009). Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1; 27 (10): 1685-93.
- Leyland-Jones, B. & Smith, B. R. (2011). Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *The Lancet Oncology*, 12 (3), 286–95.
- Lin, N.U. & Winer, E.P. (2007). Brain metastases: The HER2 paradigm. *Clinical Cancer Research*, 13: 1648–1655.

- Lipton, A., Ali, S. M., Leitzel, K., Demers, L., Chinchilli, V., Engle, L. & Allard, J. (2002). Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20 (6), 1467–72.
- Lipton, A., Ali, S.M., Leitzel, K., Demers, L., Harvey, H.A., Chaudri-Ross, H.A., Brady, C., Wyld, P. & Carney W. (2003). Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology*, 15; 21 (10): 1967-72
- Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S.M., Carney, W., Platek, G., Steplewski, K., Westlund, R., Gagnon, R., Martin, A.M. & Maltzman, J. (2011). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) extracellular domain levels are associated with progression-free survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer receiving lapatinib monotherapy. *Cancer*, 1;117 (21): 5013-20.
- Liu, P. C. C., Covington, M., Huber, R., Hillman, M., Stow, M., Burns, D. & Friedman, S. (2006). Identification of ADAM10 as a Major Source of HER2 Ectodomain Sheddase Activity in HER2 Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Biology & Therapy*, 5 (6), 657–664.
- Liu, X.W., Bernardo, M.M., Fridman, R. & Kim, H.R. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 10; 278 (41): 40364-72.
- Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T. & Perou, C.M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*, Feb; 19 (2):264-71.
- Loo, L., Capobianco, J. A., Wu, W., Gao, X., Shih, W. Y., Pourrezaei, K. & Adams, G. P. (2011). Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers (PEMS). *Analytical Chemistry*, 83 (9), 3392–3397.
- Lower, E.E., Glass, E., Blau, R. & Harman, S. (2009). HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113 (2): 301-6. 14.
- Ludovini, V., Gori, S., Colozza, M., Pistola, L., Rulli, E., Floriani, I., Pacifico, E., Tofanetti, F.R., Sidoni, A., Basurto, C., Rulli, A., & Crinò L. (2008). Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Annals of Oncology*, 19 (5): 883-90.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Fenton, S.E., Troyer, K.L., Reidel, R.F., Chang, A. & Lee, D.C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*, 126: 2739–2750.
- MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S. & Passe, S. (1984). Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185 (2):201-204.
- MacEwen, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. (1990). *Cancer Metastasis Reviews*, 9 (2): 125-36.

- Magnifico, A., Albano, L., Campaner, S., Delia, D., Castiglioni, F., Gasparini, P., ... Tagliabue, E. (2009). Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clinical Cancer Research*, 15 (6), 2010–21.
- Malinowski, D.P. (2007). Multiple biomarkers in molecular oncology. II. Molecular diagnostics applications in breast cancer management. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 7 (3):269-80.
- Manion, E., Hornick, J.L., Lester, S.C. & Brock, J.E. (2011). A comparison of equivocal immunohistochemical results with anti-HER2/neu antibodies A0485 and SP3 with corresponding FISH results in routine clinical practice. *American Journal of Clinical Pathology*, 135 (6): 845-51.
- Maniscalco, L., Iussich, S., de Las Mulas, J. M., Millán, Y., Biolatti, B., Sasaki, N. & De Maria, R. (2012). Activation of AKT in feline mammary carcinoma: a new prognostic factor for feline mammary tumours. *Veterinary Journal*, 191 (1), 65–71.
- Maniscalco, L., Millán, Y., Iussich, S., Denina, M., Sánchez-Céspedes, R., Gattino, F. & De Maria, R. (2013). Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in triple negative feline mammary carcinomas. *BMC Veterinary Research*, 9, 80-85.
- Maria, R. De, Olivero, M., Iussich, S., Nakaichi, M., Murata, T., Biolatti, B. & Renzo, D. (2005). Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer. *Cancer Research*, 65 (3), 907–912.
- Mass, R., Sanders, C. & Charlene, K. (2000). The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 19: 75a, (abstr291)
- Massie, C., & Mills, I. G. (2006). The developing role of receptors and adaptors. *Nature Reviews*, 6, 403–409.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N. & Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer Research and Treatment*, 136 (2), 331–45.
- Matos, A.J.F., Lopes, C., Carvalheira, J., Santos, M., Rutteman, G.R. & Gartner, F. (2006). E-cadherin expression in canine malignant mammary tumors: relationship to other clinico-pathological variables. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 182-189.
- Mehta, R.R., McDermott, J.H., Hieken, T.J., Marler, K.C., Patel, M.K., Wild, L.D., das Gupta, T.K. (1998). Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 16 (7): 2409-16.
- Meyer, D., & Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, 378 (78), 386–90.
- Miettinen, P. J., Chin, J. R., Shum, L., Slavkin, H. C., Shuler, C. F., Derynck, R., & Werb, Z. (1999). Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genetics*, 22 (1), 69–73.

- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 79(3):225-32.
- Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Della Santa, D. & Poli, A. (2005). Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potencial. *Veterinary Pathology*, 42 (1), 30-34.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., & Poli, a. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 98 (1), 115–20.
- Millipore (1997). *Protein blotting applications guide*. Acedido em 13 Outubro, 2012, disponível em <http://www.fisher.co.uk/index.php/en/technical-support?view=kb&kbartid=262&fileid=496>.
- Millipore (2013). *Type 1 (Ultrapore) Milli-Q*. Acedido em Agosto 10, 2013, disponível em: http://www.millipore.com/lab_water/clw4/type1.
- Minke, J. M. H. M., Cornelisse, C. J., Stolwijk, J. A. M., Kuipers-dijkshoorn, N. J., Rutteman, G. R., & Misdorp, W. (1990). Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Feline Mammary Tumors. *Cancer Research*, 50 (13):4003-7.
- Misdorp, W. (1991). Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 125 Suppl 1:27-31.
- Misdorp, W., Romijn, A. & Hart, A.A. (1991) Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Research*, 11(5):1793-7.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals (2nd ed., Vol. VII). Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), Tumors in domestic animals (4rd ed.). (pp. 575-606). Iowa: Iowa State Press, Blackwell Publishing Company.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26 (45), 6469–6487.
- Modiano, J.F. & Breen, M. (2007). The Etiology of Cancer. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), Small animal clinical oncology (4th ed.). (pp. 3-39). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Moelans, C. B., de Weger, R. a, Van der Wall, E. & van Diest, P. J. (2011). Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Critical reviews in Oncology/Hematology*, 80 (3), 380–92.

- Moelans, C.B., de Wegers, R.A., Monsuurs, H.N., Maess, A.H., van Diest, P.J. (2011). Molecular differences between ductal carcinoma in situ and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study. *Cellular Oncology*, 34 (5): 475-82.
- Mol, J.A., van Leeuwen, L.I., van Garderen, E. & Rijnberk, A. (2000). Progesterin-induced mammary growth hormone (GH) production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480: 71-6.
- Molina, R., Jo, J., Filella, X., Zanon, G., Pahisa, J., Munoz, M., Farrus, B., Latre, M.L., Gimenez, N. & Hage, M. (1996). C-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Research*, 16:2295–300.
- Molina, M. A., Sáez, R., Ramsey, E. E., Sa, R., Rojo, F., Evans, A. J. & Lluch, A. (2002). NH2-terminal Truncated HER-2 Protein but not Full-Length Receptor Is Associated with Nodal Metastasis in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 8, 347–353.
- Moore, A.S. & Ogilvie, G.K. (2001). *Feline oncology: a comprehensive guide to compassionate care*. (1st ed.). Trenton, New Jersey: Veterinary Learning Systems.
- Mori, S., Mori, Y., Mukaiyama, T., Yamada, Y., Sonobe, Y., Matsushita, H., Sakamoto, G., Akiyama, T., Ogawa, M. & Shiraishi M. (1990). In vitro and in vivo release of soluble erbB-2 protein from human carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 81 (5): 489-94.
- Morris, J.K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D. & Lee KF. (1999). Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron*, 23 (2): 273-83.
- Morris, S. R., & Carey, L. a. (2007). Molecular profiling in breast cancer. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 8 (3), 185–98.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K. & Yamaguchi, R. (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *The Journal of Veterinary Medical Science - The Japanese Society of Veterinary Science*, 62 (7), 743–50.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K. & Yamaguchi, R. (2000). Amplification of the cyclin A gene in canine and feline mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science - The Japanese Society of Veterinary Science*, 62 (7), 783–7.
- Nagasaki, K., & Miki, Y. (2006). Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer*, 13 (1), 2–7.
- Nagata, Y., Furugen, R., Hiasa, A., Ikeda, H., Ohta, N., Furukawa, K., Nakamura, H., Furukawa, K., Kanematsu, T. & Shiku, H. (1997). Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *Journal of Immunology*, 159 (3): 1336-43.

- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S. & Kutty, M.K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *British Journal of Cancer*, 78 (10):1385-90.
- Nandi, S., Guzman, R. C., & Yang, J. (1995). Review Hormones and mammary carcinogenesis in mice , rats , and humans : A unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 3650–3657.
- Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y., Takagi, H. (1992). C-erbB-2 protein in the sera of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24 (2): 97-102.
- Nasir, L., Krasner, H., Argyle, D.J. & Williams, A. (2000). Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia. *Cancer Letters*, 3; 155(1):1-7.
- Nicholas, F. W. (2003). *Introduction to Veterinary Genetics* (2nd Ed.). Oxford: Blackwell Publishing
- Nicholson, S. E., Metcalf, D., Sprigg, N. S., Columbus, R., Walker, F., Silva, A. & Nicola, N.A. (2005). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (7), 2328–33.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z. & Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10 (16), 5367–74.
- Novosad, C. A. (2003). Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 107–9.
- Novosad, C.A., Bergman, P.J., O'Brien, M.G., McKnight, J.A., Charney, S.C., Selting, K.A., Graham, J.C., Correa, S.S., Rosenberg, M.P.& Gieger, T.L. (2006). Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42 (2):110-20.
- Olayioye, M.A. (1999). ErbB Receptor-induced Activation of Stat Transcription Factors Is Mediated by Src Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (24), 17209–17218.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., & Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network : receptor heterodimerization in development and cancer. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 19 (13).
- Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Sherer, D. & Sorenmo, K.U. (2005) Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 19 (4): 560-563.
- Owens, M.A., Horten, B.C. & da Silva, M.M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clinical Breast Cancer*, 5 (1): 63-9.
- Paik, S., Bryant, J., Park, C., Fisher, B., Tan-Chiu, E., Hyams, D. & Wolmark, N. (1998). erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive,

- hormone receptor-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90 (18), 1361–70.
- Paik, S., Bryant, J., Tan-Chiu, E., Romond, E., Hiller, W., Park, K., Brown, A., Yothers, G., Anderson, S., Smith, R., Wickerham, D.L. & Wolmark N. (2002). Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Journal of the National Cancer Institute*, 5; 94 (11): 852-4.
- Pallud, C., Guinebretiere, J. M., Guepratte, S., Hacene, K., Neumann, R., Carney, W. & Pichon, M. F. (2005). Tissue expression and serum levels of the oncoprotein HER-2/neu in 157 primary breast tumours. *Anticancer Research*, 25 (2B), 1433–1440.
- Paoloni, M. & Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews. Cancer*. 8 (2):147-56.
- Papouchado, B.G., Myles, J., Lloyd, R.V., Stoler, M., Oliveira, A.M., Downs-Kelly, E., Morey, A., Bilous, M., Nagle, R., Prescott, N., Wang, L., Dragovich, L., McElhinny, A., Garcia, C.F., Ranger-Moore, J., Free, H., Powell, W., Loftus, M., Pettay, J., Gaire, F., Roberts, C., Dietel, M., Roche, P., Grogan, T. & Tubbs, R. (2010). Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34 (6): 767-76.
- Park, J.W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L.Y., & Keller, G.A. (1995). Development of anti-p185^{HER2} immunoliposomes for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:1327–31.
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T. & Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (8), 1160–7.
- Payne, R. C., Allard, J. W., Anderson-Mausser, L., Humphreys, J. D., Tenney, D. Y. & Morris, D. L. (2000). Automated assay for HER-2/neu in serum. *Clinical Chemistry*, 46 (2), 175–82.
- Pedersen, K., Angelini, P.D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M.P., Ferrer-Ramón, C. & Arribas, J. (2009). A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29 (12), 3319 – 31.
- Peles, E. & Yarden, Y. (1993). Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays*, 15 (12): 815-24.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX (509), 10-34.
- Peñafiel-Verdu, C., Buendia, a J., Navarro, J. a, Ramirez, G. a, Vilafranca, M., Altimira, J., & Sanchez, J. (2012). Reduced expression of E-cadherin and β -catenin and high expression of basal cytokeratins in feline mammary carcinomas with regional metastasis. *Veterinary Pathology*, 49 (6), 979–87.

- Penzo, C., Ross, M., Muirhead, R., Else, R. & Argyle, D. J. (2009). Effect of recombinant feline interferon-omega alone and in combination with chemotherapeutic agents on putative tumour-initiating cells and daughter cells derived from canine and feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7 (4), 222–9.
- Peppercorn, J., Perou, C.M. & Carey, L.A. (2008). Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Investigation*, 26 (1):1-10.
- Perez, A. M.D., Peña L., del Castillo, N., Nieto, A.I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 41 (7): 287-91.
- Pérez-Alenza, M.D., Jiménez, A., Nieto, A.I. & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research*, 6 (4), R300-307.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de R. M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 17; 406 (6797): 747-52.
- Perrimon, N. & Perkins, L. A. (1997). There must be 50 ways to rule the signal: the case of the *Drosophila* EGF receptor. *Cell*, 89 (1), 13–6.
- Petterino, C., Ratto, A., Podestà, G., Drigo, M. & Pellegrino, C. (2007). Immunohistochemical evaluation of STAT3-p-tyr705 expression in feline mammary gland tumours and correlation with histologic grade. *Research in Veterinary Science*, 82 (2): 218-24.
- Pharoah, P.D., Day, N.E. & Caldas C. (1999). Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 80 (12):1968-73.
- Piccart, M., Lohrisch, C., Di Leo, A. & Larsimont D. (2001). The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2, 73-82.
- Pick, E., Kluger, Y., Giltneane, J. M., Moeder, C., Camp, R. L., Rimm, D. L. & Kluger, H. M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Research*, 67 (7), 2932–7.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L. & Yarden, Y. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 15 (10), 2452–67.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G. & Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1; 90 (5):1746-50.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X. & Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12 (5): R68.

- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. & Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related Cancer*, 8 (1), 11–31.
- Press, M.F., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D.J. (1990). Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, 5 (7): 953-62.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C. & Marcato, P.S. (1995). Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 113 (4): 301-13.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Mandriolo, L. & Marcato, P.S. (2002). Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 73, 53–60.
- Pupa, S.M., Ménard, S., Morelli, D., Pozzi, B., de Palo, G. & Colnaghi, M.I. (1993). The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene*, 8 (11): 2917–2923.
- Quirke, P., Pickles, A., Tuzi, N.L., Mohamdee, O., & Gullick, W.J. (1986). Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *British Journal of Cancer*, 60 (1): 64-9.
- Raharison, F. & Sautet, J. (2006). Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *Journal of Morphology*, 267 (3), 292-299.
- Raharison, F. & Sautet J. (2007). The topography of the lymph vessels of mammary glands in female cats. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 36:442-452.
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., Palacios, J., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., Schmitt, F.C., Tan, P.H., Tse, G.M., Badve, S. & Ellis, I.O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*, 12:207.
- Rampaul, R. S., Pinder, S. E., Gullick, W. J., Robertson, J.R. & Ellis, I. O. (2002). HER-2 in breast cancer--methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 43 (3), 231–44.
- Ramsey, I. (2011). *Small animal formulary* (7th ed.). Gloucester, United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.
- Rasotto, R., Caliarì, D., Castagnaro, M., Zanetti, R., & Zappulli, V. (2011). An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 144 (2-3), 170–9.
- Reinsberg, J. (1996). Different efficacy of various blocking reagents to eliminate interferences by human anti-mouse antibodies with a two-site immunoassay. *Clinical Biochemistry*, 29: 145–148.
- Reis-Filho, J.S. & Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*, 19; 378(9805): 1812-23.

- Reiss, K. & Saftig, P. (2009). The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20 (2), 126–37.
- Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V. M., Poli, A., Benazzi, C. & Sarli, G. (2009). Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 46 (5), 860–8.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R. & Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389:725–730.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19 (49), 5548–57.
- Roskoski, R. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319 (1), 1–11.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A, Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Symmans, W.F. & Hortobagyi, G. N. (2004). Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3 (4), 379–98.
- Ross, J. S., Slodkowska, E. a, Symmans, W. F., Puztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist*, 14 (4), 320–68.
- Rossi, S., Laurino, L., Furlanetto, A., Chinellato, S., Orvieto, E., Canal, F. & Dei Tos, A. P. (2005). Rabbit Monoclonal Antibodies: A Comparative Study Between a Novel Category of Immunoreagents and the Corresponding Mouse Monoclonal Antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 124 (2), 295–302.
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K. & Puztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11 (16), 5678–85.
- Rozan, S., Vincent-Salomon, A., Zafrani, B., Validire, P., De Cre- moux, P., Bernoux, A., Nieruchalski, M., Fourquet, A., Clough, K., Dieras, V., Pouillart, P., and Sastre-Garau, X. (1998). No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 79: 27–33.
- Rubin, I. & Yarden, Y. (2001).The basic biology of HER2. *Annals of Oncology*, 12 Suppl 1: S3-8
- Rutteman, G.R., Blankenstein, M.A., Minke, J. & Misdorp. W. (1991). Steroid receptors in mammary tumours of the cat. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 125 Suppl 1:32-7
- Sáez, R., Molina, M.A., Ramsey, E.E., Rojo, F., Keenan, E.J., Albanell, J., Lluch, A., García-Conde, J., Baselga, J. & Clinton, G.M. (2006). p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 15; 12 (2): 424-31.

- Saghatchian, M., Guepratte, S., Hacene, K., Neumann, R., Floiras, J.L. & Pichon, M.F. (2004). Serum HER-2 extracellular domain: relationship with clinicobiological presentation and prognostic value before and after primary treatment in 701 breast cancer patients. *The International Journal of International of Biological Markers*, 19 (1):14-22
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology - Hematology*, 19:183–232.
- Santinelli, A., Pisa, E., Stramazzotti, D., & Fabris, G. (2008). HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *International Journal of Cancer*, 122 (5), 999–1004.
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, 68 (4), 989–97.
- Sassi, F., Benazzi, S., Castellani, G., Sarli, G. (2010). Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6: 5.
- Sauter, G., Lee, J., Bartlett, J.M., Slamon, D.J. & Press, M.F. (2009). Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of Clinical Oncology*, 10; 27 (8):1323-33.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I. & Weinberg, R.A. (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 6-12; 312 (5994):513-6.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F. & Pals G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 15; 30(12):e57.
- Scott, G. K., Robles, R., Park, J. W., Montgomery, P. a, Daniel, J., Holmes, W. E., ... Fendly, B. M. (1993). A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 13 (4), 2247–57.
- Segatto, O., King, C. R., Pierce, J. H., Di Fiore, P.P. & Aaronson, S.A. (1988). Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 8 (12), 5570 – 4.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., Bento, M. J., & Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, 187 (1), 65–71.
- Shah, S.S., Ketterling, R.P., Goetz, M.P., Ingle, J.N., Reynolds, C.A., Perez, E.A. & Chen B. (2010). Impact of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on HER2 interpretation in breast cancer. *Human Pathology*, 41 (1): 103-6

- Shewry, P.R. & Fido, R.J. (1998). Protein Blotting. *Molecular Biomethods Handbook* 435-444
- Shi, Y., Huang, W., Tan, Y., Jin, X., Dua, R., Penuel, E., Mukherjee, A., Sperinde, J., Pannu, H., Chenna, A., DeFazio-Eli, L., Pidaparathi, S., Badal, Y., Wallweber, G., Chen, L., Williams, S., Tahir, H., Larson, J., Goodman, L., Whitcomb, J., Petropoulos, C. & Winslow, J. (2009). A novel proximity assay for the detection of proteins and protein complexes: quantitation of HER1 and HER2 total protein expression and homodimerization in formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines and breast cancer tissue. *Diagnostic Molecular Pathology*, 18 (1): 11-21.
- Siegel, P. M., Ryan, E. D., Cardiff, R. D., & Muller, W. J. (1999). Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18 (8), 2149–64.
- Siegel, S. & Castellan, N.J. (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. (2nd ed.). New York: McGraw Hill
- Siemens (2012). *ADVIA Centaur Serum HER-2/neu Assay Specifications*. Acedido em Novembro 14, 2012, disponível em <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaur-cp-immunoassay-sys>.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 9; 235 (4785):177-82.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 12; 244 (4905):707-12.
- Soares, M., Correia, J., Rodrigues, P., Simões, M. & Matos, A. De. (2013). Feline HER2 Protein Expression Levels and Gene Status in Feline Mammary Carcinoma: Optimization of Immunohistochemistry (IHC) and In Situ Hybridization (ISH) Techniques. *Microscopy and Microanalysis*, 19, 876–882.
- Sørensen, P.D., Jakobsen, E.H., Langkjer, S.T., Bokmand, S., Ostergaard, B., Olsen, D.A. (2009). Serum HER-2 concentrations for monitoring women with breast cancer in a routine oncology setting. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47 (9): 1117–23.
- Sorkin, A., Di Fiore, P.P. & Carpenter, G. (1993). The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimeras is internalization impaired. *Oncogene*, 8 3021–3028.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11; 98 (19):10869-74.
- Spigel, D.R. & Burstein, H.J. (2002). HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 3, 63–174

- Sternlicht, M.D., Bissell, M.J. & Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene*, 21; 19(8): 1102-13.
- Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 463–516.
- Stetler-Stevenson, W.G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science Signaling*, 8;1 (27):re6.
- Strehl, J.D., Wachter, D.L., Fasching, P.A., Beckmann, M.W. & Hartmann, A. (2011). Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes. *Breast Care*, 6 (4):258-264.
- Sturgeon, C.M., Duffy, M.J., Stenman U.H., Lilja, H., Brünner, N., Chan, D.W., Babaian, R., Bast, R.C, Dowell, B., Esteva, F.J., Haglund, C., Harbeck, N., Hayes, D.F., Holten-Andersen, M., Klee, G.G., Lamerz, R., Looijenga, L.H., Molina, R., Nielsen, H.J., Rittenhouse, H., Semjonow, A., Shih, I.M., Sibley, P., S  l  tormos, G., Stephan, C., Sokoll, L., Hoffman, B.R. & Diamandis, E.P. (2008). National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical Chemistry*, 54 (12):e11-79.
- Sugano, K., Ushiyama, M., Fukutomi, T., Tsuda, H., Kitoh, T. & Ohkura, H. (2000). Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissues and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse. *International Journal of Cancer*, 20; 89 (4): 329-36.
- Tan, L.-D., Xu, Y.-Y., Yu, Y., Li, X.-Q., Chen, Y. & Feng, Y.-M. (2011). Serum HER2 level measured by *Dot Blot*: a valid and inexpensive assay for monitoring breast cancer progression. *PloS One*, 6 (4), e18764.
- Tanner, M., Gancberg, D., Leo, D., Larsimont, D., Rouas, G. & Piccart, M. J. (2000). Chromogenic in Situ Hybridization: A Practical Alternative for Fluorescence in Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples Minna. *American Journal of Pathology*, 157 (5), 1467–1472.
- Thermo-Scientific (2013). *Pierce™ Horseradish Peroxidase*. Acedido em 12 Agosto, 2013, disponível em http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/productsdetail_11152___13575990_-1.
- Thorpe, G.H. & Kricka, L.J. (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology*, 133: 331-53.
- Todeschini, P., Cocco, E., Bellone, S., Varughese, J., Lin, K., Carrara, L., Guzzo, F., Buza, N., Hui, P., Silasi, D.A., Ratner, E., Azodi, M., Schwartz, P.E., Rutherford, T.J., Pecorelli, S. & Santin, A.D. (2011). Her2/neu extracellular domain shedding in uterine serous carcinoma: implications for immunotherapy with trastuzumab. *British Journal of Cancer*, 11; 105 (8): 1176-82.
- Tokunaga, E., Kimura, Y., Oki, E., Ueda, N., Futatsugi, M., Mashino, K., Yamamoto, M., Ikebe, M., Kakeji, Y., Baba, H. & Maehara, Y. (2006). Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *International Journal of Cancer*, 15; 118 (2):284-9.

- Trosko, J.E. (2001). Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Molecular Carcinogenesis*, 30 (3):131-7.
- Tsé, C., Brault, D., Gligorov, J., Antoine, M., Neumann, R., Lotz, J.P. & Capeau, J. (2005). Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clinical Chemistry*, 51 (7): 1093-101.
- Tsé, C., Gauchez, A.-S., Jacot, W. & Lamy, P.-J. (2012). HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38 (2), 133–42.
- Tubbs, R.R., Pettay, J.D., Roche, P.C., Stoler, M.H., Jenkins, R.B. & Grogan, T.M. (2001). Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *Journal of Clinical Oncology*, 15; 19 (10): 2714-21.
- Turner, N.C. & J S Reis-Filho, J.S. (2006). Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*, 25, 5846–5853.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S. & Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (10), 5276–87.
- Uyama, R., Hong, S.H., Nakagawa, T., Yazawa, M., Kadosawa, T., Mochizuki, M. & Sasaki, N. (2005). Establishment and characterization of eight feline mammary adenocarcinoma Tcell lines. *The Journal of Veterinary Medical Science - The Japanese Society of Veterinary Science*, 67 (12), 1273–6.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A. & Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309 (5967): 418–425.
- Uniprot (2012). *Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*. Acedido em Novembro 20, 2012, disponível em <http://www.uniprot.org/uniprot/P04626>. Vail, D.M. & MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18, 781–792.
- van Leeuwen, I.S., Hellmèn, E, Cornelisse, C.J., van den Burgh, B. & Rutteman. G.R. (1996). P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research*, 16 (6B): 3737-44.
- Vazquez-Martin, A., Fernandez-Real, J.M., Oliveras-Ferraros, C., Navarrete, J.M., Martin-Castillo, B., Del Barco, S., Brunet, J. & Menendez, J.A. (2009). Fatty acid synthase activity regulates HER2 extracellular domain shedding into the circulation of HER2-positive metastatic breast cancer patients. *International Journal of Oncology*, 35 (6): 1369-76.

- Vinatzer, U., Dampier, B., Streubel, B., Pacher, M., Seewald, M. J., Stratowa, C. & Schreiber, M. (2005). Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clinical Cancer Research*, 11 (23), 8348–57.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*. 10 (8) :789-99.
- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. & Poulsen, H. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology*, 8, 1197–1206.
- Vollan, H.K.M. & Caldas, C. (2011). The breast cancer genome - a key for better oncology. *BMC Cancer*, 11:501.
- Wallasch, C., Weiss, F. U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W., & Ullrich, A. (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2 / neu oncogenic signaling by heterodimerization with. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 14 (17), 4267–75.
- Weigel, M.T. & Dowsett, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, 23; 17(4):R245-62.
- Weigelt, B., Baehner, F. L. & Reis-Filho, J. S. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of Pathology*, 220: 263–280.
- Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular Oncology*, 4 (3), 192–208.
- Weijer, K., Calafat, J., Daams, J.H., Hageman, P.C. & Misdorp, W. (1974). Feline malignant mammary tumors. II. Immunologic and electron microscopic investigations into a possible viral etiology. *Journal of National Cancer Institute*. 52 (3):673-9.
- Weijer, K., & Hart, A.A. (1983). Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 70 (4), 709–16.
- Weiner, D.B., Liu, J., Cohen, J.A., Williams, W.V. & Greene, M.I. (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature*, 18; 339 (6221):230-1.
- Wieduwilt, M. J., & Moasser, M. M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (10), 1566–1584.
- Wilking, U., Karlsson, E., Skoog, L., Hatschek, T., Lidbrink, E., Elmberger, G., Johansson, H., Lindström, L. & Bergh, J. (2011). HER2 status in a population-derived breast cancer cohort: discordances during tumor progression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125 (2): 553-61.

- Winston, J., Craft, D.M., Scase, T.J., Bergman, P.J. (2005). Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 3 (1): 8-15.
- Witzel, I., Loibl, S., von Minckwitz, G., Mundhenke, C., Huober, J., Hanusch, C. & Müller, V. (2010). Monitoring serum HER2 levels during neoadjuvant trastuzumab treatment within the GeparQuattro trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123 (2), 437–45.
- Witzel, I., Loibl, S., von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Fehm, T., Khandan, F., Schmatloch, S., Hauschild, M., Bischoff, J., Fasching, P.A., Mau, C., Schem, C., Rack, B., Meinhold-Heerlein, I., Liedtke, C., Karn, T., Huober, J., Zu Eulenburg, C., Issa-Nummer, Y., Untch, M. & Müller, V. (2012). Predictive value of HER2 serum levels in patients treated with lapatinib or trastuzumab - a translational project in the neoadjuvant GeparQuinto trial. *British Journal of Cancer*, 107 (6): 956-60.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J. & Hayes, D. F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (1), 118–45.
- World Health Organization (1979). *Handbook for reporting results of cancer treatment*. Genève: WHO.
- Worthylake, R., Opresko, L. K., & Wiley, H. S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (13), 8865–74.
- Wülfing, P., Borchard, J., Buerger, H., Heidl, S., Zänker, K. S., Kiesel, L., & Brandt, B. (2006). HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 12 (6), 1715–20.
- Yamauchi, H., O'Neill, A., Gelman, R., Carney, W., Tenney, D.Y., Hösch, S., & Hayes, D.F. (1997). Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *Journal of Clinical Oncology*, 15 (7): 2518-25.
- Yang, M., Han, H., Li, J., Wang, F., Zhang, C., Yao, J. & Shi, Y. (2012). Relationship between serum HER2 extracellular domain levels, tissue HER2 expression, and clinico-pathological parameters in early stage breast cancer. *Chinese Medical Journal*, 125 (22), 4104–4110.
- Yarden, Y. & Schlessinger, J. (1987). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 26 (5), 1434–42.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2 (2), 127–37.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and Its Importance. *Oncology*, 61 (suppl 2), 1–13.

- Yaziji, H., Goldstein, L.C., Barry, T.S., Werling, R., Hwang, H., Ellis, G.K., Gralow, J.R., Livingston, R.B. & Gown, A.M. (2004). HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *Journal of the American Medical Association*, 28; 291(16):1972-7.
- Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M. & Gelmon, K.A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*, 11 (2):174-83.
- Yuan, C.-X., Lasut, A. L., Wynn, R., Neff, N. T., Hollis, G. F., Ramaker, M. L. & Meade, R. (2003). Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. *Protein Expression and Purification*, 29 (2), 217–222.
- Zabrecky, J. R., Lam, T., McKenzie, S. J., & Carney, W. (1991). The Extracellular Domain of p185/neu is Released from the Surface of Human Breast Carcinoma Cells, SK-BR-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (3), 1716–1720.
- Zaczek, A., Brandt, B. & Bielawski, K.P. (2005). The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histology and Histopathology*, 20 (3): 1005-15.
- Zappulli, V., De Zan, G., Cardazzo, B., Bargelloni, L. & Castagnaro, M. (2005). Feline mammary tumors in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, 72, 98-106.
- Zappulli, V., de Cecco, S., Trez, D., Caliari, D., Aresu, L. & Castagnaro, M. (2012). Immunohistochemical expression of E-cadherin and β -catenin in feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2-3):161-70
- Zhan, L., Xiang, B. & Muthuswamy, S.K. (2006). Controlled activation of ErbB1/ErbB2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of ErbB2-overexpressing tumors. *Cancer Research*, 2006 May 15; 66 (10): 5201-8.
- Zhang, H., Cheng, X., Richter, M. & Greene, M.I. (2006). A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum, *Nature Medicine*, 12, 473–477.
- Zhang, H., Fu, T., McGettigan, S., Kumar, S., Liu, S., Speicher, D. & Xu, X. (2011). IL8 and Cathepsin B as Melanoma Serum Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (3), 1505–18.
- Zhang, K., Sun, J., Liu, N., Wen, D., Chang, D., Thomason, A. & Yoshinaga, S.K. (1996). Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *Journal of Biological Chemistry*, 16; 271 (7): 3884-90.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125 (6), 1137–49.
- Zwick, E., Wallasch, C. & Ullrich, A. (2000). HER2/neu: a target for breast cancer therapy. *Breast Disease*, 11: 7-18.

RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DA ONCOPROTEÍNA HER2 NA GATA

Soares, M.J. ¹; Coelho, N. ¹; Correia, J. ¹; Ferreira, F.¹

¹CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Univ. Técnica de Lisboa



IX CONGRESSO
HOSPITAL VETERINÁRIO MONTENEGRO
MEDICINA E CIRURGIA FELINA

- 23 e 24 DE FEVEREIRO DE 2013 - EUROPARQUE - SANTA MARIA DA FEIRA -



Anexo 1 – Primeiro diapositivo da apresentação de uma comunicação livre no Congresso de Medicina Veterinária do Hospital Montenegro, onde o aluno foi co-autor.

Anexo II – Poster em Congresso



DETERMINATION OF HER2 SERUM LEVELS IN CATS BY A NOVEL IMMUNOBLOT ASSAY

Soares, Maria; Coelho, Nuno; Correia, Jorge; Peleteiro, Maria; Ferreira, Fernando

CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal



ABSTRACT

Introduction

Epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a biomarker that has prognostic and therapeutic value and, is overexpressed in 15 to 30% of the women breast tumors. Recently, it was shown that HER2 extracellular domain (ECD-HER2) can be shed into the bloodstream circulation by proteolytic cleavage and detected in the serum of the patients by ELISA assays, which are correlated with the HER2 tumor-tissue status.

Feline Mammary Tumors (FMT) are one of the most common malignant disease, usually very aggressive and associated with poor prognosis. Considering the high frequency of HER2 overexpression among FMT (30 to 40%) this study aimed to develop and validate an inexpensive immunoblot assay to identify and measure the HER2 serum levels in cat.

Material & Methods

The optimization of the immunoblot assay was performed by using different primary antibodies anti-HER2 (A0485, DAKO; 4B5, Ventana; SP3, Zytomed) and HER2 serum levels were determined in 8 healthy female cats and 29 animals with FMT employing a calibration curve performed with a purified truncated ECD-HER2 protein (eBioscience). The Kendall correlation coefficient was used to analyze the agreement between HER2 tissue-levels and serum levels.

Results

The novel assay allowed the detection of HER2 in cat serum. A cutoff level of 10 µg/ml was chosen based on the healthy animals serum evaluation. The agreement between immunohistochemistry and immunoblot results for HER2 was 68.9% ($p < 0.05$).

Conclusion

The measurement of HER2 serum levels by immunoblot can be used as a new diagnostic tool, for detection of feline mammary tumors that overexpress HER2.

Acknowledgments

Maria Soares is supported by a FCT-PhD fellowship (SFRH/BD/70720/2010). The authors would like to thank to Sandra Carvalho, Tiago Silva and André Beselga, for their technical assistance; to the Faculty of Medicine Veterinary Teaching Hospital, the Clínica Veterinária Zoomédica and the IMet Montjo, for help in the follow-up clinical evaluation. Finally we would like to thank to Dr. João Matos and Dr. José Cabeçadas, from Instituto Português de Oncologia (IPO).

References

1. Soenen O, et al. (2013). In: Witrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (5th ed.), 538-556.
2. De Maria, et al. (2008). *Cancer Res*, 68(3), 907-912.
3. O'Grady J, et al. (2007). *BMJ Cancer*, 7, 179.
4. Soares M, et al. (2013). *Microsc. Microanal.* 19: 1-7.
5. Kong Y, et al. (2012). *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 275-284.
6. Yeushalmi R, et al. (2010). *Lancet Oncol*, 11(2), 174-83.
7. Wolff AC, et al. (2007). *Arch Pathol Lab Med*, 131(1), 18-43.
8. Lam L, et al. (2012). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826: 199-208.
9. T. W. LO, et al. (2011). *Plos One*, 6(4), 18764.
10. Esteva F, et al. (2005). *Breast Cancer Research*, 7: R438-R443.
11. Masopust W, et al. (1999). In: World Health Organization International histological classification of tumours of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology and World Health Organization (2nd ed, vol 7), 11-27.
12. Estlin CW & Ellis IO (1998). In: *Rosen's Breast Pathology*, 385-392.
13. Jucys R & Dobson JM. (2012). *Vel. J.*, 19(1), 19-26.



INTRODUCTION

The mammary tumours are very common in clinical practice, with a study pointing an annual incidence rate of 25.4/100 000, representing 17% of the tumors in the female cats. The vast majority of feline mammary tumors are malignant tumours, with an aggressive biologic behavior¹. Feline Mammary Carcinomas (FMC) shows age, incidence, histopathology and pattern of metastasis similar to human breast cancer. In addition, recent studies have demonstrated a high incidence of FMC with overexpression of HER2 protein (30-40%), which makes this species a potential model for comparative oncology studies^{2,3,4}.

In Human Breast Cancer, HER2 overexpression is associated with shorter overall survival and disease survival, when compared with HER2 negative breast tumors⁵. The HER2 protein belongs to the human epidermal growth factor's family and is composed of three portions: the extracellular domain (ECD), that is cleaved from the cell membrane and is a target for specific therapy (Herceptin[®], Genetech), a transmembrane domain and the internal tyrosine kinase domain, essential to activate the intracellular pathways^{5,6}. Usually the classification of this type of tumors uses molecular techniques like immunohistochemistry (IHC) and hybridization *in situ* (ISH), that evaluate the HER2 status in the tissue, generally in the primary tumor⁷. Recently, several studies have measured the concentrations of serum ECD HER2 in breast cancer patients and found a significant correlation with the tissue HER2 status^{8,9,10}. Serum ECD HER2 quantification or semi-quantification represents a noninvasive and quantifiable biomarker that could supplement the existing HER2 evaluation methods and is generally performed by ELISA assays⁹. Tan et al., (2011) used for the first time dot blot assay technique to determine the ECD HER2 levels and found a high correlation with the ELISA assay⁹. Our objective was to use the dot blot technique in order to develop and validate an inexpensive assay to identify and measure the HER2 serum levels in cat, which can potentially be used in the clinical veterinary oncology.

MATERIAL & METHODS

Animals and samples

A total of 37 animals were recruited for this study, where 8 were healthy female cats that underwent to ovariectomy and 29 were subjected to a mastectomy due the presence of mammary tumors. The tissue samples removed in surgery were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 to 48 hours, according to the American Society of Clinical Oncology (ASCO) guidelines⁷. From each animal, 1 to 2 ml of peripheral blood was collected into a tube without anticoagulant before the surgery. Serum samples were centrifuged at 3 000 g for 10 minutes at room temperature and serum was stocked in 0,2 ml aliquots and stored at -80°C.

Immunohistochemistry

The histopathological diagnosis was performed in all tumors before the immunohistochemistry study^{11,12}. For HER2 evaluation it was used a monoclonal antibody anti-HER2 (CB11, Zymed), and a peroxidase-conjugated detection system (Novocastra, Leica). The chromogen was diaminobenzidine (DAB) counterstained with Mayer's hematoxylin. The HER2 staining was scored according ASCO guidelines where 0 represents no staining; 1+, weak, incomplete membranous staining in any proportion of tumor cells; 2+, complete membrane staining that is either no uniform or weak in intensity but with obvious circumferential distribution in at least 30% of cells; and finally 3+, uniform intense membrane staining of at least 30% of invasive tumor cells⁷.

Dot Blot assay

One µl of each serum sample was spotted into a nitrocellulose membrane. In addition, a purified truncated ECD-HER2 protein (eBioscience) with known concentration was used for construction of a calibration curve, through a series of dilutions with block solution (Figure 1).

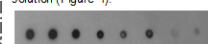


Figure 1: Calibration curve with eight different concentrations of ECD-HER2 (100 µg/ml; 75 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 20 µg/ml; 15 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml) (from the left to the right).

After blocked in a 1% Bovine serum albumin (BSA) solution for 30 minutes, the membranes were incubated overnight (16h) at 4°C with different primary antibodies anti-HER2 A0485 (DAKO), 4B5 (Ventana) and SP3 (Zytomed) and then incubated at room temperature for 30 minutes with the secondary antibody anti-rabbit. Finally the dots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Clarity Western ECL Substrate) (Figure 2).

The cut-off was achieved based on the results of the healthy animals, like occurs in human studies⁸. The serum samples were classified as negative if below the cutoff and positive when greater.

Statistical analysis

The Kendall correlation coefficient was used for correlation between HER2 levels detected by IHC or Dot blot and p-values less than 0.05 were considered as statistically significant.

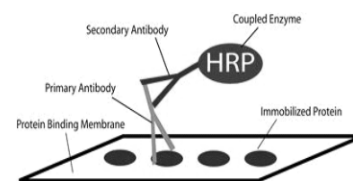


Figure 2: Illustrative scheme of dot blot assay.

RESULTS

HER2 expression in primary mammary carcinomas

Among the 29 cases, 16 were negative for HER2 (8 cases classified as 0 and 8 cases classified as 1+) and 13 animals presented HER2 overexpression (8 scored 2+ and 5 cases classified as 3+) (Figure 3).

HER2 expression in feline serum samples

By dot blot assay, all the antibodies identified the HER2 protein in feline serum samples, either in the healthy animals or oncologic patients. Blood specimen collection and processing is very important, with false positives whenever occurs hemolysis (Figure 4). The cut off was defined as 10 µg/ml and 17 cases were considered negative for HER2 expression in blood samples (≤10 µg/ml) while 12 samples were considered positive (>10 µg/ml) (Figure 5).

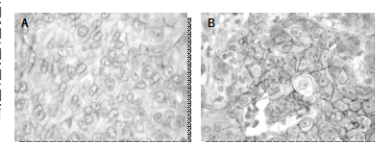


Figure 3: HER2 expression in primary feline mammary carcinomas (400x, Mayer's Hematoxylin). A, Solid carcinoma, classified as 1+ by IHC; B, Tubular carcinoma, scored 2+.

Correlation between HER2 levels in the tissue samples (IHC) and serum levels (Dot blot)

The 20 animals showed a high correlation between HER2 levels detected by dot blot and IHC, with a concordance of 68.9%. The Kendall correlation coefficient presented a $p=0.035$.

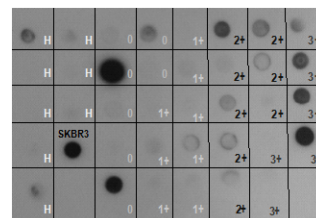


Figure 5: HER2 serum levels detected by dot blot assay. SKBR3 was used as positive control, once is a cell line with recognized HER2 overexpression. H, Healthy female cats, 0, 1+, 2+ and 3+, IHC score in the evaluation of the tumoral tissue.

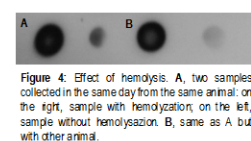


Figure 4: Effect of hemolysis. A, two samples collected in the same day from the same animal; on the right, sample with hemolysis; on the left, sample without hemolysis. B, same as A but with other animal.

CONCLUSIONS

The measurement of HER2 serum levels in feline patients with mammary carcinoma showed a high concordance with the expression of HER2 in the tumoral tissue. To our knowledge, this is the first report of the detection of HER2 in the peripheral blood in cats.

In Veterinary Oncology several efforts have been made to find molecular biomarkers, in order to improve the diagnosis and the treatment in the small animals⁹. The dot blot is a simple, easy and inexpensive assay and can be used as a new diagnostic tool, for detection and semi-quantification of HER2 levels in feline patients.

Anexo 2 – Poster apresentado no Congresso Europeu de Oncologia Veterinária, 2013, tendo o aluno como co-autor.